

Lys ^{1,9} - Bradykinin und

Lys ^{2,10} - Kallidin,

eine Studie zur Frage von
synthetischen Naturstoffanaloga.

Hans-Georg Heidrich

1964



Lys^{1,9}-Bradykinin und Lys^{2,10}-Kallidin,

eine Studie zur Frage von synthetischen Naturstoffanaloga.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt

von

Hans-Georg Heidrich

1964

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Graßmann
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Huisgen
- Tag der mündlichen Prüfung: 22.7.1964

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit
von September 1962 bis Februar 1964 am
Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Le-
derforschung, München, unter der Leitung
von Herrn Prof. Dr. W. Graßmann ausgeführt.

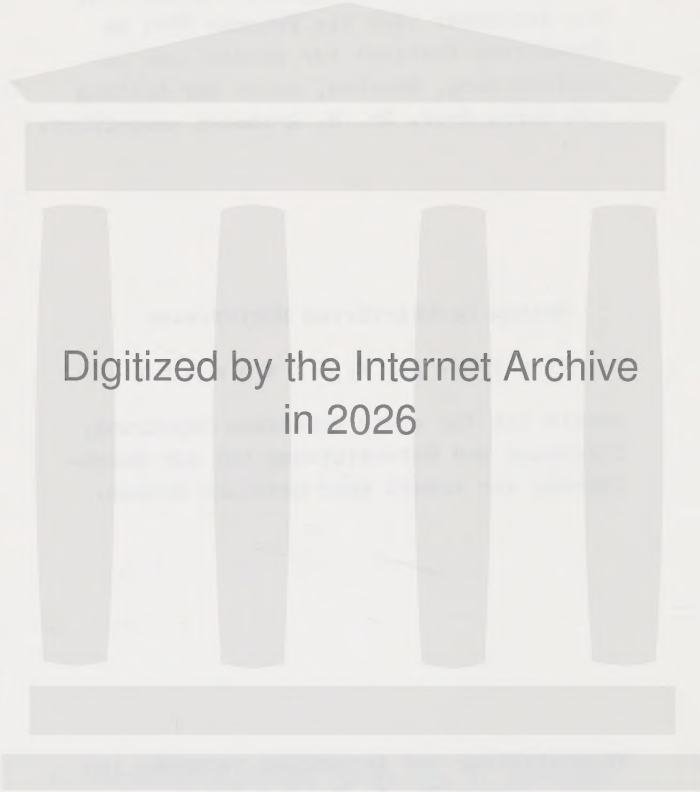
Meinem hochverehrtem Doktorvater

Herrn Prof. Dr. W. G r a ß m a n n

möchte ich für stets erwiesene Belehrung,
Förderung und Unterstützung bei der Durch-
führung der Arbeit sehr herzlich danken.

Themastellung und Anregungen verdanke ich
Herrn Dr. E. W ü n s c h .

Auch Herrn Dr. H. E n d r e a s bin ich für
die kameradschaftliche Aufnahme in seinem
Labor für die Zeit der Ausführung meiner
Doktorarbeit zu Dank verpflichtet.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Dem Andenken meines Vaters

Prof. Dr. L. Heidrich.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
I.1 Allgemeines über Kinine	1
I.2 Wirkstoff und Rezeptor	8
I.3 Aufgabenstellung	8
II. Darlegung der Ergebnisse	10
II.1 Schutzgruppen	10
II.2 Synthesemethoden	10
II.3 Chromatographische Kontrolle	11
II.4 Verwendete Abkürzungen	11
II.5 Durchführung der Synthese von Lys ^{1,9} -Bradykinin und Lys ^{2,10} -Kallidin	12
II.5.a Die Sequenz Lys-Pro-Pro-Gly	13
II.5.b Die Sequenz Lys-Lys-Pro-Pro-Gly	16
II.5.c Die Sequenz Phe-Ser-Pro	16
α) Versuche zur Darstellung	17
β) Das Serinproblem	19
γ) Darstellung der Sequenz	20
II.5.d Die Sequenz Phe-Ser-Pro-Phe-Lys	21
II.5.e Lys ^{1,9} -Bradykinin	24
II.5.f Lys ^{2,10} -Kallidin	29
II.6 Pharmakologischer Test	33
II.7 Enzymatischer Abbau	34
III. Experimenteller Teil	41
III.1 Lysin ^{1,9} -Bradykinin	41
III.2 Lysin ^{2,10} -Kallidin	53
III.3 Enzymchemische Versuche	56
IV. Zusammenfassung	58
V. Literatur	59

I. Einleitung

I.1 Allgemeines über Kinine

Unter Kinin-Hormonen versteht man eine Gruppe von pharmakologisch wirksamen Polypeptiden, welche die glatte Muskulatur und den Blutdruck beeinflussen. Sie werden im Blut oder im Gewebe aus inaktiven Vorstufen enzymatisch freigesetzt, werden also in keiner speziellen Drüse gebildet. Nach dieser Definition gehören zur Gruppe der Kinin-Hormone Angiotensin I und II¹⁾, Bradykinin²⁾, Kallidin³⁾ und die Substanz P⁴⁾. Die inaktiven Vorstufen der Angiotensine, von Bradykinin und Kallidin sind in der α_2 -Globulin-Fraktion der Säugetiere enthalten; aus diesem Grunde bezeichnet man diese drei Hormone auch als Plasmakinine. Die Substanz P wird bevorzugt im Intestinaltrakt (Darmwand) und im Zentralnervensystem (Hirn) gebildet. Während die Aminosäuresequenzen der Plasmakinine bekannt sind, weiß man von der Substanz P bisher nur, daß sie ein empfindliches Polypeptid vom Molekulargewicht ca. 1650+350 ist und die Aminosäuren Arg, Pro, Gly, Phe, Ser, Val, Leu und Ileu enthält⁴⁾.

Im Laufe der Zeit haben sich die gegebenen Definitionen dahin entwickelt, daß man unter der Bezeichnung Kinin lediglich die schon klassischen Kinin-Hormone der Säugetiere Bradykinin und Kallidin versteht. Diese Vereinfachung wird im Folgenden auch benützt.

Einige zusammenfassende Darstellungen über das Gebiet der Kinine finden sich bei ⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾.

1.1.a Bildung von Bradykinin und Kallidin

Der Mechanismus der Freisetzung von Bradykinin und Kallidin aus einer inaktiven Vorstufe, einem Protein der α_2 -Globulin-Fraktion der Säugetiere mit Hilfe des Enzyms Kallikrein ähnelt weitgehend dem der Blutgerinnung⁹⁾. Beide Vorgänge lassen sich in zwei Phasen aufteilen, die Freisetzung der Enzyme und den Angriff der Enzyme unter Bildung von Kinin bzw. Fibrin:

Kininbildung

1.Phase

Kallikreinogen $\xrightarrow[\text{Hageman-Faktor}]{\text{Trypsin, Papain}}$ Kallikrein

2.Phase

Kininogen $\xrightarrow{\text{Kallikrein}}$ Kinin

Abbau

Kinin $\xrightarrow{\text{Peptidasen}}$ Inaktivierung

Blutgerinnung

1.Phase

Prothrombin $\xrightarrow[\text{Hageman-Faktor}]{\text{Thrombokinase}}$ Thrombin

2.Phase

Fibrinogen $\xrightarrow{\text{Thrombin}}$ Fibrin

Abbau

Fibrin $\xrightarrow{\text{Proteol.Enzyme}}$ Abbau

1.Phase des Kininsystems: Kallikreinbildung

Über die erste Phase des Kininsystems, die Kallikreinbildung, ist noch wenig bekannt. Fest steht, daß die Bildung des Kallikreins durch Entfernung inhibierender Grup-

pen mit Hilfe von Trypsin oder Papain eingeleitet wird¹⁰⁾ und daß der Hageman-Faktor ("plasma thromboplastic factor E") eine entscheidende Rolle spielt⁹⁾. Über chemische Konstitution und Wirkungsmechanismus dieses aktivierenden Faktors besteht noch keine Klarheit¹¹⁾.

Unter **K a l l i k r e i n e n** ¹⁰⁾ versteht man eine Gruppe von Warmblüterenzymen, welche in kleinen Dosen bei i.v. Injektionen am Hund Blutdrucksenkung hervorrufen. Derartige Enzyme wurden im Harn, im Pankreas, der Submaxillaris und im Blut gefunden. Sie sind untereinander nicht identisch. Harn- und Pankreaskallikrein wurden bis zu chemisch einheitlichen Substanzen angereichert; auch Blutkallikrein wurde hoch gereinigt. Das Molekulargewicht der Kallikreine ist zwischen 24 000 - 33 000 relativ niedrig, was für eine Permeation durch Kapillaren wichtig sein könnte.

2.Phase des Kininsystems: Kininbildung

Die Kinine werden auf enzymatischem Wege aus ihrer Vorstufe, dem Kininogen gebildet, welches in der α_2 -Globulin-Fraktion des Säugetierplasmas vorkommt. Bradykininogen und Kallidinogen sind identisch¹²⁾. Ihr Molekulargewicht beträgt um 100 000. An kininfreisetzenden Enzymen sind die Kallikreine, ferner Trypsin und einige Schlangengifte bekannt.

I.1.b Chemie von Bradykinin und Kallidin

Schon in Jahre 1937 konnte Werle beobachten, daß Kallikrein aus Serum eine Substanz freisetzt, die eine selbständige, die glatte Muskulatur erregende und blutdrucksenkende Wirkung entfaltet¹⁰⁾¹³⁾. Er charakterisierte diese Substanz als ein niedermolekulares Polypeptid und bezeichnete sie als **K a l l i d i n** ¹⁴⁾. Die erste Anreicherung

des Kallidins gelang Werle 1951¹⁵⁾.

In der Zwischenzeit hatte die Arbeitsgruppe um Rocha e Silva das blutdrucksenkende Polypeptid Bradykinin gefunden und sehr reine Produkte davon isoliert¹⁶⁾. Die erstmalige Isolierung des Bradykinins in einheitlicher Substanz gelang Elliott 1960²⁾ aus Rinderplasma mit Hilfe von Trypsin, anschließender Enteiweißung, Gegenstromverteilung und Säulenchromatographie. In dieser Gruppe wurde auch nach Aminosäuresequenzanalyse die folgende Oktapeptidformel vorgeschlagen:



Nach der Synthese dieses Oktapeptids erwies sich das synthetische "Bradykinin" als völlig unwirksam¹⁷⁾. Erst durch erneute Analyse¹⁸⁾ und darauffolgende Synthese konnte Boissonnas 1960 die wahre Konstitution des Bradykinins als die eines Nonapeptids der Sequenz



sicherstellen¹⁹⁾. Das synthetische Produkt erwies sich auch in den pharmakologischen Testen als identisch mit dem natürlichen Material.

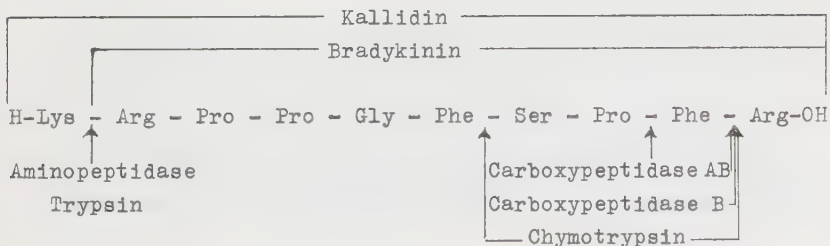
Isolierung und Strukturaufklärung des Kallidins wurden im Jahre 1961 zu gleicher Zeit von Werle³⁾ und Pierce und Webster³⁾ durchgeführt. Werle erhielt aus säurebehandeltem Rinderplasma mit Hilfe von hochgereinigtem Kallikrein aus Schweinesubmaxillaris zu 10 % Bradykinin und zu 90 % Kallidin, während Pierce und Webster Bradykinin und Kallidin zu gleichen Teilen isolierten. Das Kallidinmolekül besitzt die Aminosäuresequenz des Bradykinins mit einem zusätzlichen N-terminalen Lysin:

Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg

Die Bestätigung dieser Struktur gelang Boissonnas 1962 durch Synthese²⁰⁾.

Im Jahre 1963 konnte Elliott²¹⁾ zeigen, daß die in der Proteinkette vor dem N-terminalen Lysin stehende Aminosäure Methionin ist, sodaß Kallikrein wahrscheinlich die Sequenz X-Met¹Lys-X spezifisch spaltet. Erst durch die den Kallikreinrohprodukten beigemengten Peptidasen wird aus dem primär gebildeten Kallidin das Bradykinin in Freiheit gesetzt: Tatsächlich werden durch Kallikrein aus Pankreas, Submaxillaris und Harn nebeneinander Kallidin u n d Bradykinin gebildet, wobei die Mengenverhältnisse mit zunehmendem Reinheitsgrad des verwendeten Kallikreins zugunsten von Kallidin verschoben sind²²⁾.

Nach Injektionen nimmt die Kininwirkung im Organismus nach Erreichen eines Maximums rasch ab. Nach Werle erfolgt die Inaktivierung der Kinine durch Aminopeptidasen und Carboxypeptidasen²³⁾. Der enzymatische Abbau von Bradykinin ist nur vom Carboxylende her möglich. Carboxypeptidase B sowie Chymotrypsin spalten die Peptidbindung zwischen Phe-Arg, Carboxypeptidase A und B im Gemisch auch die zwischen Pro-Phe. Chymotrypsin löst die Bindung zwischen Phe-Ser⁶⁾.



Der enzymatische Abbau von Kallidin am N-terminalen Ende erfolgt durch Trypsin und Aminopeptidasen zwischen Lys-Arg. Am Carboxylende ist er analog dem von Bradykinin.⁶⁾

I.1.c Pharmakologie der Kinine

Bradykinin und Kallidin sind in ihrer pharmakologischen Wirksamkeit qualitativ völlig gleich und unterscheiden sich nur durch ihre relative Wirksamkeit an verschiedenen Objekten²⁴⁾. Im Vordergrund der Kininwirkung stehen die Erregung glatter Muskulatur, die Erweiterung peripherer Gefäße, die Erhöhung der Gefäßpermeabilität und die Wirkung auf sensible Strukturen (Schmerzerregung).

Wirkung auf die glatte Muskulatur

Glattmuskuläre Organe sind noch heute bevorzugte Testobjekte für Kinine in vitro¹³⁾. Die Empfindlichkeit ist außerordentlich groß, am isolierten Meerschweinchenileum z.B. 10^{-9} g/ml²⁵⁾. Der isolierte Rattenuterus ist noch bedeutend empfindlicher. Außer auf die glatte Muskulatur von Uterus, Darm und Gefäßen wirkt Bradykinin auf die Bronchialmuskulatur.

Alle diese Reaktionen verlaufen langsam ("slow reacting substance"); der Mechanismus ist noch nicht geklärt.

Wirkung auf den Kreislauf

Kinine wirken nach i.v. Injektionen oder Infusionen am Menschen oder am narkotisierten Hund blutdrucksenkend. Es steht fest, daß sowohl Bradykinin als auch Kallidin nicht primär auf das kontraktile System des Herzmuskels, sondern hauptsächlich auf die peripheren Gefäße wirken. Als Folge dieser peripheren Gefäßerweiterung kommt es

dann sekundär zum Abfall des systolischen und diastolischen Druckes.

Der Blutdrucksenkung wirkt stets der Abbau durch bluteigene Enzyme entgegen. Dieser ist auch die Ursache für die sehr kurze Halblebenszeit von infundiertem Kinin beim Menschen, von Bradykinin z.B. weniger als 30 Sekunden.

Wirkung auf die Gefäßpermeabilität

Nach i.c. Injektionen von Bradykinin wird starke Quaddelbildung der Haut beobachtet; bei der Ratte entwickelt sich nach subplanarer Verabreichung ein dosisabhängiges Pfotenödem. Quantitative Aussagen über die Wirkung i.c. gegebener Kinindosen können mit Hilfe eines i.v. verabreichten Farbstoffes gemacht werden.

Erregung neuraler Strukturen

Rohes und auch hochgereinigtes Bradykinin erregen Schmerz, wenn man sie z.B. auf die Basis einer Cantharidenblase aufbringt oder auch i.c. oder i.a. injiziert ("pain producing substance"). Auch viscerale, in Gefäßnähe liegende Nervenendigungen sprechen auf Kinin an. Neben diesen peripheren Wirkungen haben einige Autoren auch eine direkte zentrale beobachtet, z.B. Atmungserregung an der Katze nach intracarotidealer Kininapplikation.

I.2. Wirkstoff und Rezeptor

Für die biologische Wirksamkeit von Hormonen, Toxinen oder Pharmaka wird in letzter Zeit mehr und mehr die Reaktion dieser Stoffe mit einem im Körper vorhandenen Rezeptor gefordert. Diese Forderung verlangt nach einer Erforschung von Chemie und Stereochemie dieser Rezeptoren. Eine Möglichkeit, etwas zu diesem Problem zu erfahren, ist die Veränderung der biologisch wirksamen Molekel und die Beobachtung der daraus resultierenden Änderung der Wirksamkeit. Viele der heute erkannten Rezeptoren haben Proteincharakter, sodaß ihre Spezifität durch die Folge der Aminosäuren und deren funktionellen Gruppen geprägt wird. Aus diesem Grunde müßten synthetisch zugängliche und abwandelbare Peptidwirkstoffe gute Modellsubstanzen sein, um etwas über die Frage Wirkstoff/Rezeptor zu erfahren.

Diese Tatsachen gelten auch für die Rezeptoren der Kinine. Der Bradykinin-Rezeptor z.B. scheint eine sehr große Spezifität zu haben, denn schon ein Fehlen von Pro⁷ vermindert die biologische Wirksamkeit um 10^4 mal gegenüber der des Naturproduktes, ein Austausch des Pro⁷ durch Gly um 10^2 mal¹⁷⁾¹⁹⁾²⁶⁾.

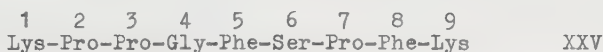
I.3. Aufgabenstellung

Es war die Aufgabe vorliegender Arbeit, Analoga von Bradykinin und Kallidin zu synthetisieren, in deren Aminosäuresequenz Arginin jeweils durch Lysin ersetzt werden sollte. Der Grund für diese Veränderung der Kininmolekel war die Frage, ob zur biologischen Wirksamkeit - also zur Vereinigung von Kinin und Kininrezeptor - lediglich eine

basische Aminosäure oder ganz speziell die Guanidogruppe des Arginins notwendig ist. Ist nur eine basische Aminosäure notwendig, so müßte ein Lys^{1,9}-Bradykinin oder ein Lys^{2,10}-Kallidin dieselbe oder nur wenig veränderte biologische Wirksamkeit haben wie die natürlichen Kinine. Ein ähnliches Experiment bei Angiotensin II brachte als Resultat ein Produkt, das 100 mal weniger wirksam war als das Naturprodukt²⁷⁾.

Die zu synthetisierenden Polypeptide sollten also die folgende Aminosäuresequenz haben:

Lys^{1,9}-Bradykinin:



Lys^{2,10}-Kallidin:



Die hergestellten Substanzen sollten ferner auf ihre biologische Wirksamkeit und auf ihre sterische Einheitlichkeit durch enzymatischen Abbau untersucht werden.

II. Darlegung der Ergebnisse

II.1 Schutzgruppen

Zum Schutze von Amino- und Carboxylgruppen wurden die in der Peptidsynthese allgemein verwendeten Schutzgruppen verwendet.

Aminogruppen wurden entweder mit der Carbobenzoxygruppe²⁸⁾ oder mit der t-Butyloxycarbonylgruppe²⁹⁾ geschützt.

Die Carbobenzoxygruppe konnte in allen Fällen ohne Schwierigkeiten mit Hilfe von katalytisch erregtem Wasserstoff bei Normaldruck abhydriert werden. Dabei wurde beobachtet, daß ein Zusatz von Eisessig die Abspaltung stark beschleunigte.

Die t-Butyloxycarbonylgruppe wurde mit Hilfe von wasserfreier Trifluoressigsäure bei Raumtemperatur abgespalten und das dabei entstandene Peptidtrifluoracetat durch Dowex II (Acetatform) in das entsprechende Peptidacetat übergeführt.

Carboxylgruppen wurden entweder mit der Methyl-, der Benzyl- oder der p-Nitrophenylestergruppe blockiert. Die Methylester wurden mit Alkali verseift³⁰⁾, die Benzylestergruppe durch katalytische Hydrierung entfernt³¹⁾. Die p-Nitrophenylester³²⁾ wurden als stark aktivierte Verbindungen durch freie Aminogruppen von Aminosäuren oder Peptiden aminolytisch gespalten, wobei sich eine Peptidbindung ausbildet.

II.2. Synthesemethoden

Zur Verknüpfung von Aminosäuren und Peptiden wurden die Phosphorazo-, die Carbodiimid- und die Nitrophenylester-

methode³⁵⁾ verwendet.

Bei der Phosphorazomethode trat beim Einhalten der angegebenen Arbeitsvorschriften keinerlei Racemisierung auf. Die Ausbeuten waren sehr gut.

Bei der Verwendung der Carbodiimidmethode kann Racemisierung bis zu 30 % auftreten³⁶⁾. Diese läßt sich jedoch durch vorsichtiges Arbeiten verhindern. In vorliegender Arbeit wurden die Kupplungen mit Carbodiimid stets bei Temperaturen zwischen -5 und -10° durchgeführt. Durch Enzymspaltung konnte nachgewiesen werden, daß in keinem Fall Racemisierung aufgetreten war.

Die bei der Carbodiimidmethode oft beobachtete Bildung von N-Acyldicyclohexyl-Harnstoff wurde durch Verwendung von Acetonitril als Lösungsmittel bei der Reaktion ganz oder weitgehend verhindert.

Auch bei Verwendung der Nitrophenylestermethode wurde keine Racemisierung beobachtet. Die Entfernung des gebildeten Nitrophenols gelang stets durch Ausschütteln. Zur Analyse wurden die letzten Spuren von Nitrophenol mit Hilfe einer Säule aus neutralem Aluminiumoxid Woelm entfernt.

II. 3 Chromatographische Kontrolle

Zur Überprüfung auf Reinheit wurden die hergestellten Substanzen während oder nach der Synthese mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie nach Stahl³⁷⁾ aufsteigend an Kieselgel chromatographiert. Um scharfe und reproduzierbare Trennungen zu erhalten, ist es notwendig, stets mit Kammer sättigung zu arbeiten.

II.4 Zusammenstellung der verwendeten Abkürzungen

Die in vorliegender Arbeit verwendeten Abkürzungen halten sich streng an "Report of the Committee on Nomenclature",

Pergamon Press 1963.

Für Aminosäuren werden die üblichen Symbole verwendet:

Arginin	Arg	Phenylalanin	Phe
Glycin	Gly	Prolin	Pro
Lysin	Lys	Serin	Ser

Alle Aminosäuren wurden, wenn nicht besonders vermerkt, in der l-Konfiguration zur Synthese eingesetzt.

Für Substituenten werden folgende Abkürzungen geschrieben:

a. N-Schutzgruppen

Benzyloxycarbonyl-	Z-
t-Butyloxycarbonyl-	BOC-

b. COOH-Schutzgruppen

Methylester-	-OMe
Benzylester-	-OBzl
p-Nitrophenylester-	-ONP

Einige häufig verwendete Reagenzien werden wie folgt abgekürzt:

Dicyclohexylcarbodiimid	DCH
Trifluoressigsäure	TFA
Triäthylamin	TÄA

II.5 Synthese von Lys^{1,9}-Bradykinin und Lys^{2,10}-Kallidin

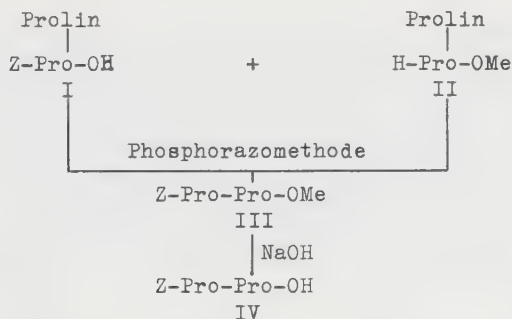
Es war naheliegend, bei der Disposition des Syntheseganges für Lys^{1,9}-Bradykinin und Lys^{2,10}-Kallidin die günstige Stellung des Glycins in Position 4 bzw. 5 so auszunützen, daß im letzten Schritt der Synthese an dieser Stelle des Moleküls zwei Peptide o h n e Racemisierungsgefahr ver-

einigt werden: Glycin besitzt kein optisch aktives Zentrum, an dem Racemisierung eintreten könnte.

Aus diesem Grunde wurde zunächst die Sequenz Lys-Pro-Pro-Gly für Lys^{1,9}-Bradykinin, bzw. Lys-Lys-Pro-Pro-Gly für Lys^{2,10}-Kallidin hergestellt und sodann beide Peptide jeweils mit der Sequenz Phe-Ser-Pro-Phe-Lys verknüpft.

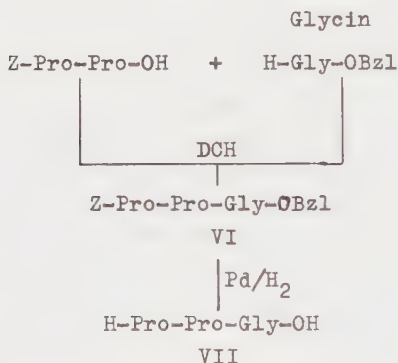
II.5.a Die Sequenz Lys-Pro-Pro-Gly

Die Darstellung des Carbobenzoxy-Dipeptids Carbobenzoxyprolyl-prolin (IV) erfolgte nach einer Vorschrift von Wunsch nach der Phosphorazomethode³⁸⁾. Auch hier, bei einer Peptidknüpfung mit N-terminalem Prolin tritt keine Racemisierung ein³⁹⁾. Eine endgültige Erklärung dieser im Experiment gefundenen Tatsache liegt noch nicht vor, da der Mechanismus derartiger Racemisierungserscheinungen nicht einwandfrei geklärt ist⁴⁰⁾.



Zum Aufbau des Tripeptids Prolyl-prolyl-glycin (VII) wurde ein Weg gewählt, der in einem Arbeitsgang die Abspaltung sowohl der Amino- als auch der Carboxylschutzgruppe ermöglichte: Carbobenzoxy-prolyl-prolin (IV) wurde nach der Carbodiimidmethode mit Glycinbenzylester (V)⁴¹⁾ umge-

setzt; die Ausbeute betrug über 85 %. Die Verbindung kristallisierte hervorragend; eine Racemisierung war wiederum unmöglich. Die Abspaltung der Carbobenzoxy- und der Benzylestergruppe gelang mit Hilfe von katalytisch erregtem Wasserstoff bei Normaldruck.

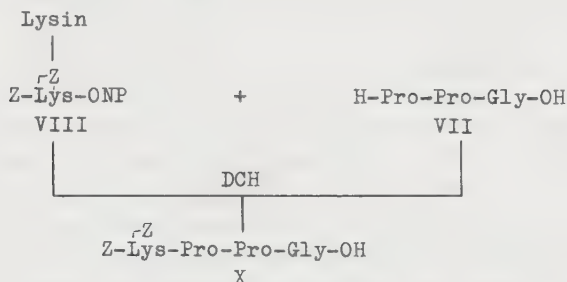


Beim Umkristallisieren des Rohproduktes von VII aus Methanol/Äther wurde stets ein kleiner Glycinfleck im Chromatogramm gefunden. Diese Spaltungsreaktion konnte durch Arbeiten bei Temperaturen unter 20° ausgeschaltet werden. Das freie Tripeptid Prolyl-prolyl-glycin (VII) kristallisierte in Form farbloser Nadelchen.

Die Angliederung des N-terminalen Lysins erfolgte auf zwei Wegen:

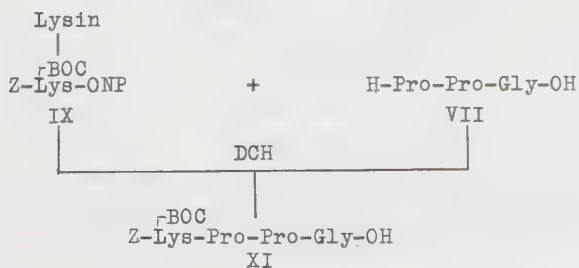
Mit Hilfe von Carbodiimid wurde aus Dicarbobenzoxyl-ysin und p-Nitrophenol der aktive Ester Dicarbobenzoxyl-ysin-nitrophenylester (VIII) hergestellt, der in Gegenwart von Triäthylamin mit dem freien Tripeptid Prolyl-prolyl-glycin (VII) in 85proz. Ausbeute zum geschützten Tetrapeptid Dicarbobenzoxyl-lysyl-prolyl-prolyl-glycin (X) reagierte.

Die Verbindung wurde in Form eines amorphen Pulvers erhalten.



Die Darstellung dieses Dicarbobenzoxy-Tetrapeptids wurde im Hinblick auf die Synthese des Lys^{1,9}-Bradykinins vorgenommen: Es wurde damit die Möglichkeit gegeben, im letzten Schritt der Synthese sämtliche Schutzgruppen in einem Arbeitsgang durch Hydrieren abzuspalten (s. II.5.e.).

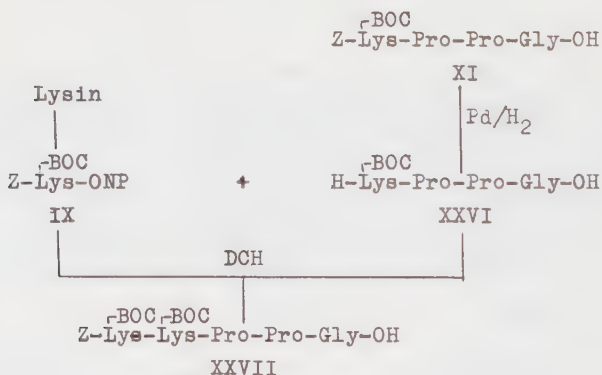
Dagegen mußte zur Synthese des Lys^{2,10}-Kallidins ein Weg eingeschlagen werden, der gestattete, die α -Aminogruppe des N-terminalen Lysins der Sequenz Lys-Pro-Pro-Gly selektiv freizusetzen unter Erhaltung der ϵ -Aminoschutzgruppe. Aus diesem Grunde wurde das freie Peptid Prolyl-prolyl-glycin (VII) nach der Nitrophenylestermethode mit N ^{α} -Carbobenzoxy-N ^{ϵ} -BOC-lysin-nitrophenylester (IX) umgesetzt.



Das erhaltene Tetrapeptid N^{α} -Carbobenzoxy- N^{ϵ} -BOC-lysyl-prolyl-prolyl-glycin (XI) ermöglichte es, die α -Aminogruppe durch katalytische Hydrierung freizusetzen und zugleich die ϵ -Aminogruppe durch den BOC-Rest geschützt zu halten.

II.5.b Die Sequenz Lys-Lys-Pro-Pro-Gly

Aus dem Syntheseweg II.5.a resultierte das geschützte Tetrapeptid N^{α} -Carbobenzoxy- N^{ϵ} -BOC-lysyl-lysyl-prolyl-glycin (XI). Bei diesem Peptid war es möglich, die α -Aminogruppe durch katalytische Hydrierung vom Carbobenzoxyrest zu befreien. Diese freie Aminogruppe wurde mit N^{α} -Carbobenzoxy- N^{ϵ} -BOC-lysin-nitrophenylester (IX) umgesetzt. Das so dargestellte geschützte Pentapeptid N^{α} -Carbobenzoxy- N^{ϵ} -BOC-lysyl- N^{ϵ} -BOC-lysyl-prolyl-prolyl-glycin (XXVII) wurde in einer Ausbeute von 86 % als amorphes farbloses Pulver erhalten.



II.5.c Die Sequenz Phe-Ser-Pro

Die vorliegende Synthese von Lys^{1,9}-Bradykinin und Lys^{2,10}-Kallidin sollte neben der Frage der biologischen Wirksam-

keit dieser Naturstoffanaloga auch noch einen Beitrag zu einem anderen, wichtigen und interessanten peptidsynthetischen Problem bringen: Es ist bei Peptidsynthesen sehr problematisch mit Serin zu arbeiten, dessen Seitengruppen-Hydroxyl nicht geschützt ist. Die freie Hydroxylgruppe kann zu Veresterungen, zu Eliminierungen und anderen Nebenreaktionen führen. Es sollte der Versuch unternommen werden, die Synthese eines Polypeptides durchzuführen und zwar ohne OH-Schutzgruppe für Serin. Dieser Versuch ließ gewisse Schwierigkeiten erwarten.

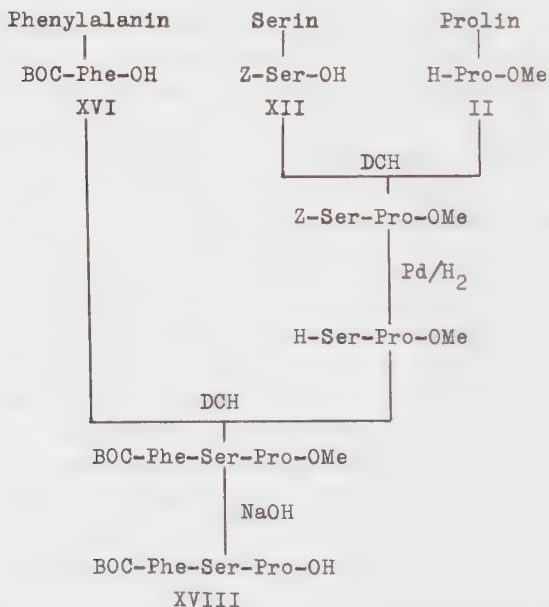
II.5.c. Versuche zur Darstellung der Sequenz Phe-Ser-Pro

Bei Beginn der Synthese war geplant, aus Carbobenzoxyserin⁴³⁾ (XII) und Prolinmethylester.Hydrochlorid⁴⁴⁾ (II) mit Hilfe von Carbodiimid den geschützten Dipeptidester Carbobenzoxy-seryl-prolyl-methylester aufzubauen, die Carbobenzoxygruppe abzuhydrieren und den freien Dipeptidester nach der Carbodiimidmethode mit BOC-Phenylalanin (XV) zu verknüpfen. Nach Verseifen des Tripeptidesters mit Alkali sollte dann das BOC-Tripeptid (XVIII) zur weiteren Synthese verwendet werden.

Die Darstellung des Carbobenzoxy-seryl-prolin-methylesters nach der Carbodiimidmethode verlief auch ohne Schwierigkeiten in guter Ausbeute. Zur Identitätskontrolle wurde er nochmals nach der Methode der "gemischten Anhydride" mit Hilfe von Chlorkohlensäureäthylester⁴⁵⁾ hergestellt. Die beiden Produkte waren absolut identisch. Auch die Abspaltung der Carbobenzoxygruppe durch katalytische Hydrierung bei Normaldruck und Anwesenheit von HCl verlief glatt: Seryl-prolinmethylester.Hydrochlorid kristallisierte in Form farbloser Nadelchen in guter Ausbeute.

Die ersten Schwierigkeiten zeigten sich bei der Darstellung des geschützten Tripeptidesters BOC-Phenylalanyl-seryl-prolin-methylester aus BOC-Phenylalanin und Seryl-

prolinmethylester. Hydrochlorid mit Hilfe von Triäthylamin und Carbodiimid: Es wurde nach der üblichen Reinigung ein Produkt mit zwei gleichstarken Flecken im Chromatogramm erhalten. Durch Umkristallisieren konnte der gewünschte BOC-Phenylalanyl-seryl-prolin-methylester in analytisch reiner Form gewonnen werden, jedoch nur in Ausbeuten von 40 %. Beim Verseifen dieses Produktes mit NaOH sowohl bei Raumtemperatur, als auch im Eisbad, zeigten sich im Chromatogramm wiederum zwei starke Flecken. Durch sehr verlustreiches Umkristallisieren wurde das gewünschte BOC-Tripeptid in sehr geringer Ausbeute und nicht sehr guter Reinheit erhalten.



Aus diesem Grunde wurde die Darstellung der Sequenz Phe-Ser-Pro auf diesem Wege verlassen.

II.5.c. Das Serin-Problem

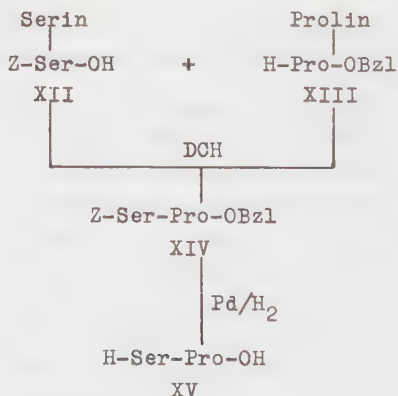
Harris und Fruton⁴⁶⁾ beobachteten schon 1951, daß bei der Verseifung von Serinpeptidestern der Sequenz Z-Ser-X-OMe mit Hilfe von Alkali neben dem gewünschten Carbobenzoxy-Dipeptid in beträchtlichem Maße eine ninhydrinpositive Substanz entsteht. Auch Hofmann und Mitarb.⁴⁷⁾ sowie Guttman und Boissonnas⁴³⁾ erhielten bei der Verseifung von ähnlich gebauten Serinpeptiden nur maximal 50 % des gewünschten Produktes. In allen Fällen war die Hydroxylgruppe des Serins nicht geschützt. Guttman und Boissonnas⁴³⁾ nahmen an, daß es sich bei dieser Nebenreaktion um eine Spaltung der Peptidbindung am Carboxylende des ungeschützten Serins handelte. Dies würde auch die Tatsache erklären, daß natürliches ACTH beim Behandeln mit Alkali seine spezifische Aktivität verliert und MSH-Aktivität im Produkt erscheint⁴⁸⁾:

Vom ACTH wird die N-terminale Sequenz $\overset{1}{\text{Ser}}-\overset{2}{\text{Try}}-\overset{3}{\text{Ser}}$ abgespalten. Das Restpeptid zeigt MSH-Aktivität.

Mit diesen Beobachtungen stimmen die unter II.5.a. erhaltenen Resultate überein: Die Verseifung des BOC-Phenylalanyl-seryl-prolin-methylesters mit NaOH ergab in nur geringer Ausbeute das gewünschte BOC-Tripeptid (XVIII) neben einer beträchtlichen Menge eines unbekannten Nebenproduktes. Im Gegensatz zu oben erwähnter Vermutung von Guttman und Boissonnas⁴³⁾ konnte keines der Nebenprodukte als Prolin identifiziert werden. Es konnte also nicht nur eine einfache Eliminierungsreaktion, bedingt durch ungeschütztes Serin-Hydroxyl und Alkali, stattgefunden haben. Es wird weiter untersucht, ob diese Beobachtungen mit Hilfe einer Umlagerungsreaktion erklärt werden können.

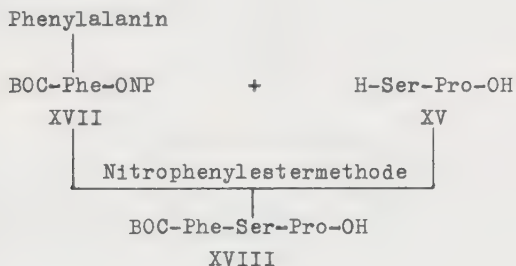
II.5.c. Darstellung der Sequenz Phe-Ser-Pro

Nach dem Vorausgesagten war es klar, daß zur Synthese der Sequenz Phe-Ser-Pro ein Weg gefunden werden mußte, bei dem eine Behandlung mit Alkali vermieden wurde. Eine Möglichkeit dazu wurde durch Verwendung des Prolinbenzylesters (XIII) gegeben: Die Benzylestergruppierung kann durch Hydrierung gespalten werden. Daher wurde nach der Carbodiimidmethode Carbobenzoxy-serin (XII) mit Prolinbenzylester⁴⁹⁾ (XIII) verknüpft; die Reaktion verlief glatt in 87proz. Ausbeute, das Produkt kristallisierte gut. Auch die Abspaltung der Carbobenzoxy- und der Benzylestergruppen durch katalytische Hydrierung bei Normaldruck bereitete keine wesentlichen Schwierigkeiten. Das freie Dipeptid Seryl-prolin (XV) wurde als farbloses Kristallpulver erhalten.



Zur Anknüpfung des Phenylalanins erschien die Nitrophenylestermethode geeignet. Es wurde aus BOC-Phenylalanin (XVI), p-Nitrophenol und Carbodiimid BOC-Phenylalanyl-nitrophenylester (XVII) hergestellt und

dieser aktive Ester mit dem freien Dipeptid Seryl-prolin (XV) umgesetzt. Die Reaktion verlief nur in 65proz. Ausbeute, lieferte aber ein kristallines Produkt, das identisch war mit dem unter II.5.c. hergestellten BOC-Tripeptid.



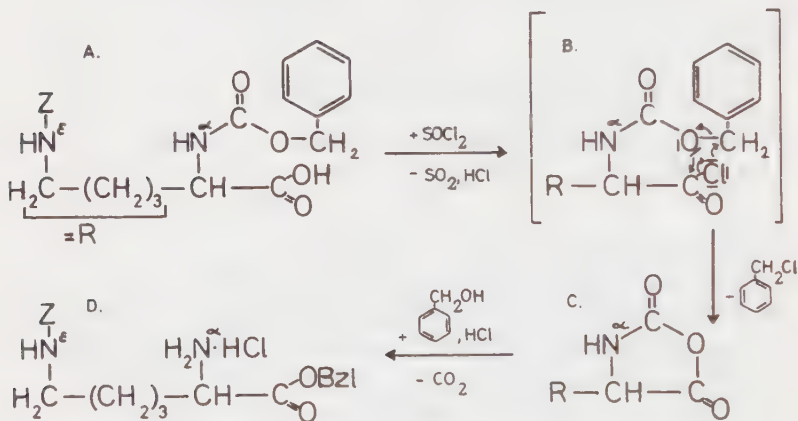
Es besteht also durchaus die Möglichkeit, bei Verwendung der geeigneten Knüpfungsmethode und Vermeidung von Alkali Peptide mit ungeschütztem Serin aufzubauen. Die ungeschützte Serin-OH-Gruppe bereitet bei Berücksichtigung dieser Forderungen auch im weiteren Syntheseweg keinerlei Schwierigkeiten mehr.*

II.5.d Die Sequenz Phe-Ser-Pro-Phe-Lys

Zum Aufbau der Sequenz Phe-Ser-Pro-Phe-Lys mußte an das unter II.5.c hergestellte N-geschützte Tripeptid BOC-Phenylalanyl-seryl-prolin (XVIII) die Sequenz Phe-Lys angegliedert werden. Wegen der Alkalilabilität von XVIII erschien es zweckmäßig, sowohl die Carboxyl- als auch die N^ε-Aminogruppe des Lysins so zu schützen, daß zur Spaltung der Estergruppierung kein Alkali verwendet werden mußte und daß nach Möglichkeit am Ende der Synthese

* vgl: Sitzung der Münchener Chemischen Gesellschaft am 29. Okt. 1963, Prof. Dr. K. Hofmann: "Studien mit partiell synthetischen Ribonucleasen", Diskussion.

alle Schutzgruppen in e i n e m Arbeitsgang zu entfernen waren. Aus Bis-Carbobenzoxy-lysin⁴²⁾ (A) wurde mit Hilfe von Thionylchlorid das N-Carbonsäureanhydrid (C) hergestellt und das vom Thionylchlorid freigewaschene Anhydrid mit überschüssigem Benzylalkohol behandelt, wobei dieses geöffnet, die N^ε-Aminogruppe als Hydrochlorid freigesetzt und die Carboxylgruppe verestert wird⁴²⁾ (D). Die Isolierung des Anhydrids und die völlige Entfernung des überschüssigen Thionylchlorids ist notwendig, da sonst bei der Veresterung

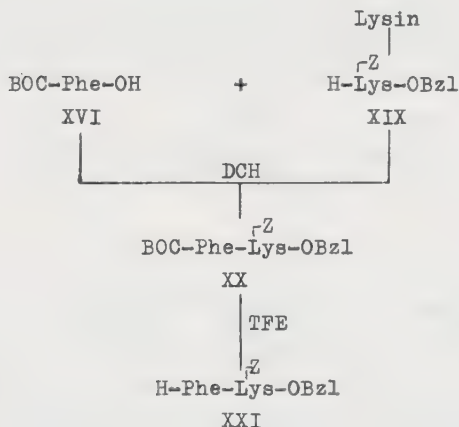


mit Benzylalkohol störendes und schwer zu entfernendes Benzylchlorid gebildet wird. Das N^ε-Carbobenzoxy-lysinbenzylester-Hydrochlorid wurde kristallin erhalten.

Dieses Produkt wurde mit Hilfe von Carbodiimid mit BOC-Phenylalanin (XVI) umgesetzt. Der resultierende geschützte Dipeptidester BOC-Phenylalanyl-N^ε-Carbobenzoxy-lysin-benzylester (XX) kristallisierte in 75proz. Ausbeute in Form kleiner verfilzter Nadelchen.

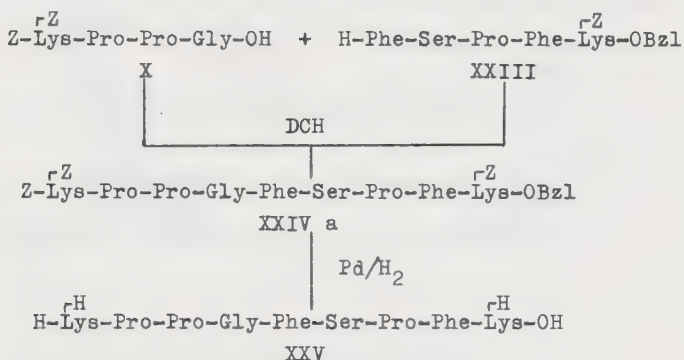
Zur weiteren Verknüpfung mit der Sequenz Phe-Ser-Pro mußte die BOC-Gruppe des N^ε-Carbobenzoxy-Dipeptidesters mit Hilfe von Trifluoressigsäure entfernt werden. Das entstandene Dipeptid-

ester-Trifluoracetat wurde mit Kaliumbicarbonat und Toluolsulfonsäure behandelt und als Tosylat isoliert (XXI).

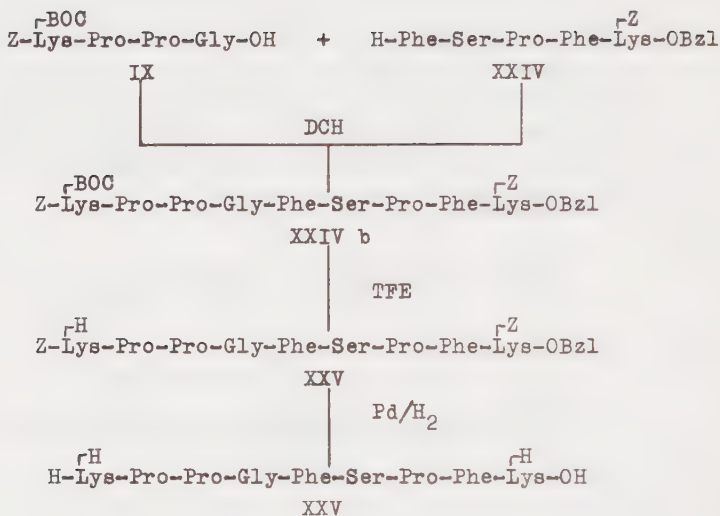


Die Verknüpfung des BOC-Tripeptides BOC-Phenylalanyl-seryl-prolin (XVIII) mit dem Dipeptidester Phenylalanyl-N^ε-Carbobenzoxy-lysinbenzylester (XXI) wurde nach der Carbodiimidmethode durchgeführt. Die Gefahr einer Racemisierung bestand nicht (vergl. II.5.a). Da die BOC-Gruppe des BOC-Phenylalanyl-seryl-prolyl-phenylalanyl-N^ε-Carbobenzoxy-lysinbenzylesters zur weiteren Synthese ohnehin abgespalten werden mußte, wurde XXII nicht isoliert, sondern das Rohprodukt wurde bei Raumtemperatur mit Trifluoressigsäure umgesetzt, das erhaltene Trifluoracetat zunächst mit Kaliumbicarbonat, dann mit Toluolsulfonsäure behandelt und das Produkt als Tosylat in 82proz. Ausbeute erhalten (XXIII).

α. Bei der Knüpfung des Kopfpeptides Dicarbobenzoxyls-lysyl-prolyl-prolyl-glycin (X) mit XXIII resultierte ein geschütztes Nonapeptid (XXIV a), bei dem alle Schutzgruppen in e i n e m Arbeitsgang, nämlich durch katalytische Hydrierung abspaltbar waren. Das Chromatogramm zeigte neben dem Hauptprodukt (XXV) noch zwei Verunreinigungen von jeweils ca. 15 %.



β. Bei Verwendung von N^α-Carbobenzoxy-N^ε-BOC-lysyl-prolyl-prolyl-glycin (XI) als Kopfpeptid wurde ein Produkt (XXIV b) erhalten, bei dem die Schutzgruppen durch zwei verschiedene Methoden abzuspalten waren. Die BOC-gruppe wurde zunächst mit Trifluoressigsäure entfernt; das entstandene Peptid-Trifluoracetat wurde durch Dowex II (Acetatform) in das Peptidacetat übergeführt. Von diesem wurden die Carbobenzoxygruppen durch katalytische Hydrierung abgespalten (XXV). Das Rohprodukt zeigte im Chromatogramm dieselben Verunreinigungen wie bei α. in ähnlichen Prozentverhältnissen.



x. Die Chromatogramme der Rohprodukte XXV zeigten neben dem gewünschten Hauptprodukt zwei Verunreinigungen. Diese konnten weder durch übliches Ausschüteln, noch durch Umkristallisieren oder Umfällen entfernt werden. Auch säulenchromatographische Trennungsversuche an CM-Cellulose⁵⁰⁾ mit Hilfe eines Essigsäure- und eines Ammoniumacetatgradienten führten nicht zu überzeugenden Ergebnissen. Eine gute Auftrennung konnte schließlich in der senkrechten kontinuierlichen Papierelektrophorese nach Graßmann und Hannig⁵¹⁾ in Pyridin/Eisessigpuffer p_H 4,9 bei 500 V und 20 mA erreicht werden (Abb.1).

Der Erfolg dieses Vorversuchs legte es nahe, eine Trennung in größerem Maßstab in der trägerfreien kontinuierlichen Elektrophorese nach Graßmann und Hannig⁵²⁾ durchzuführen.

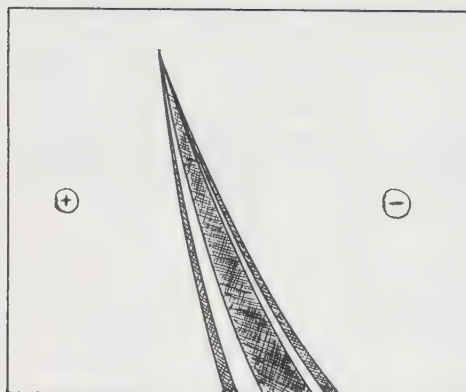


Abb. 1

Pherogramm des Rohproduktes von
Lys^{1,9}-Bradykinin

Apparatur: Elphor Va
Papier: Schleicher &
Schüll 2043b Mgl
Puffer: Pyridin/Eisessig
PH 4,9
Anfärbung: Ninhydrin

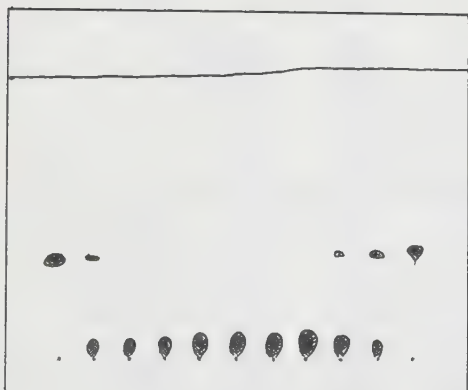
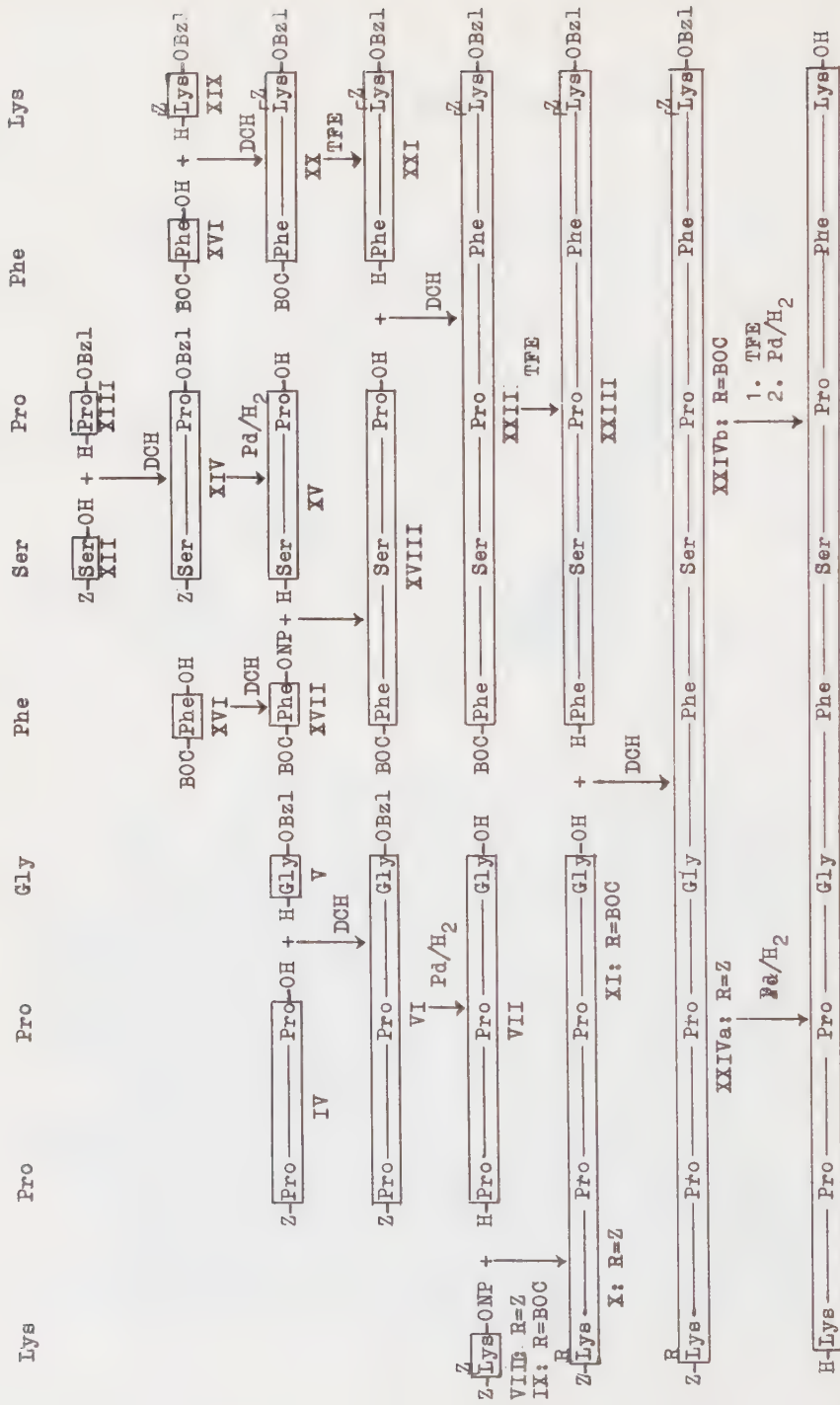


Abb. 2

Chromatographische Ver-
folgung der Reinigung von
Lys^{1,9}-Bradykinin
in der trägerfreien kon-
tinuierlichen Elektro-
phorese*

Laufmittel: Butanol/Eis-
essig/Wasser(6:2:2)
Anfärbung: Ninhydrin
Fraktionen 28 - 40

* Herrn Dr. K. Hannig danke ich für die Zurverfügungstellung der Elektrophoreseapparaturen.



Diese Trennung wurde in Pyridin/Eisessigpuffer p_H 4,9 bei 2 000 V Spannung und 200 mA Stromstärke durchgeführt; die Substanz wurde als 10proz. Lösung eingespritzt, pro Stunde 50 mg. Die Fraktionen wurden mit Ninhydrin ausgetestet, chromatographiert (Abb. 2), vereinigt und lyophilisiert. Das reine Lys^{1,9}-Bradykinin (XXV) (Abb. 3) wurde nach Umfällen als amorphes Pulver erhalten. Die Synthesewege α . und β . lieferten identische Produkte.

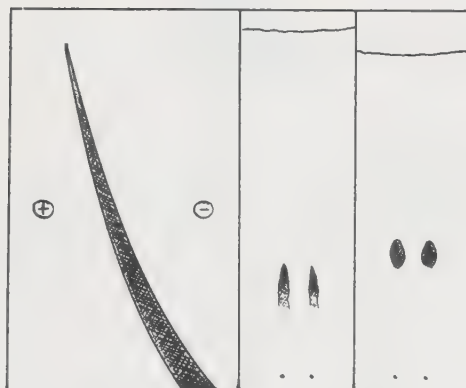


Abb. 3

Pherogramm und Chromatogramm von
Lys^{1,9}-Bradykinin
nach Reinigung

Laufmittel:

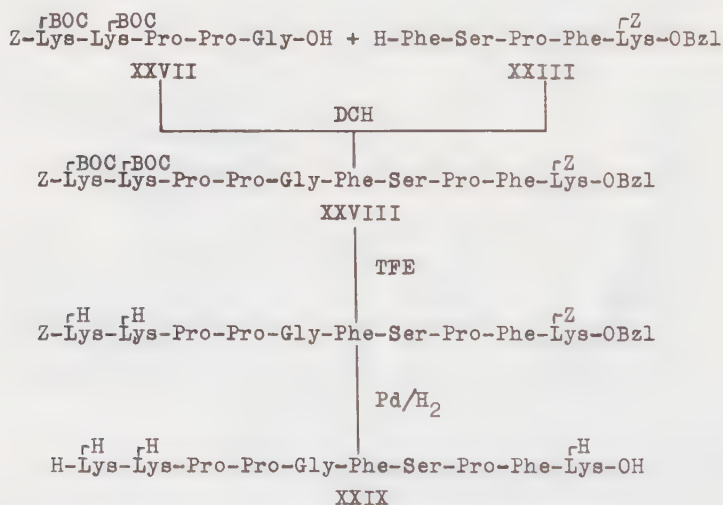
1. Butanol/Eisessig/
Wasser (1:1:1)
2. Butanol/Eisessig/
Wasser/Pyridin(
(30:6:24:20)

Anfärbung: Ninhydrin

II.5.f Synthese des Lys^{2,10}-Kallidins

Pless und Mitarb.²⁰⁾ gehen bei der Synthese von Kallidin vom synthetischen Bradykinin aus und knüpfen an dieses am N-Terminus Lysin. Das hat bei pharmakologischen Tests den Nachteil, daß ein Teil der gemessenen biologischen Aktivität des synthetischen Kallidins von eventuell noch in Spuren vorhandenem Bradykinin stammen könnte. Diese Überlegungen führten zur Disposition der vorliegenden Synthese von Lys^{2,10}-

Kallidin; Es sollte also nicht an das synthetisierte Lys^{1,9}-Bradykinin N-terminal Lysin angefügt werden, sondern das Decapeptid sollte aus zwei Pentapeptiden aufgebaut werden, durch Verknüpfung der Sequenzen Lys-Lys-Pro-Pro-Gly und Phe-Ser-Pro-Phe-Lys. Die Verknüpfung wurde analog der von Lys^{1,9}-Bradykinin mit Carbodiimid vorgenommen; das erhaltene geschützte Decapeptid (XXVIII) wurde nicht isoliert, sondern sofort von der BOC-Gruppe durch Trifluoressigsäure, von den Carbobenzoxy- und der Benzylestergruppe durch katalytische Hydrierung befreit (XXIX).



Das Rohprodukt XXIX zeigte im Chromatogramm und Pherogramm (Abb. 4) neben dem Hauptprodukt eine schwache und eine etwas stärkere Verunreinigung.

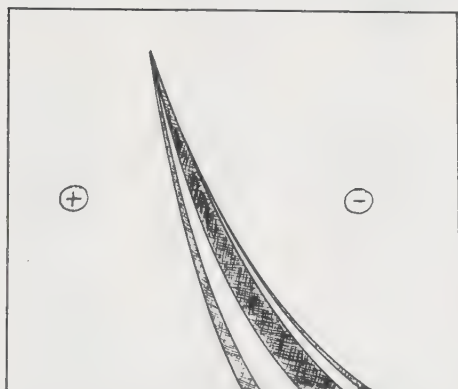


Abb. 4

Pherogramm des Roh-
produktes von
Lys^{2,10}-Kallidin

Apparatur: Elphor Va
Papier: Schleicher &
Schüll 2043b MGl
Puffer: Pyridin/Eisessig
pH_{4,9}
Anfärbung: Ninhydrin

Die Reinigung wurde wieder mit Hilfe der trägerfreien kontinuierlichen Elektrophorese in Pyridin/Eisessigpuffer vorgenommen, wobei -₁ wie erwartet - das Lys^{2,10}-Kallidin durch das zusätzliche Lys stärker kathodisch wanderte als Lys^{1,9}-Bradykinin unter gleichen Bedingungen (Abb. 5).



Abb. 5

Chromatographische Ver-
folgung der Reinigung von
Lys^{2,10}-Kallidin
in der trägerfreien kon-
tinuierlichen Elektro-
phorese

Laufmittel: Butanol/Eis-
essig/Wasser (1:1:1)
Anfärbung: Ninhydrin
Fraktionen 27 - 46



Nach Umfällen wurde das reine Produkt (XXIX) (Abb. 6) in 60proz. Ausbeute als amorphes farbloses Pulver erhalten.

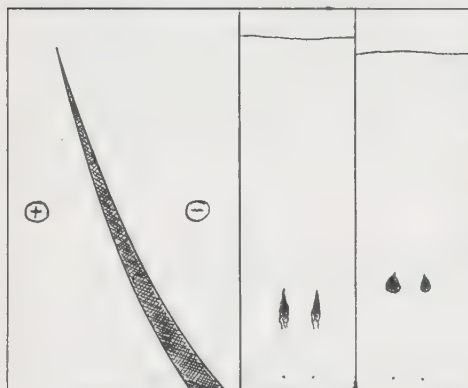


Abb. 6

Pherogramm und Chromatogramm von
Lys^{2,10}-Kallidin
nach Reinigung

Laufmittel:

1. Butanol/Eisessig/
Wasser (1:1:1)
2. Butanol/Eisessig/
Wasser/Pyridin
(30:6:24:20)

Anfärbung: Ninhydrin

II.6 Pharmakologischer Test*

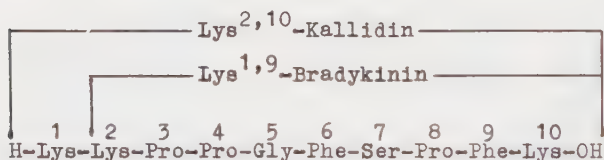
Sowohl Lys-^{1,9}-Bradykinin als auch Lys^{2,10}-Kallidin wurden am isolierten Meerschweinchenileum, am Rattenuterus und am Hund auf biologische Aktivität getestet. Bei beiden Substanzen blieb die Wirksamkeit in allen Tests zwischen 10^{-3} - 10^{-4} der Aktivität der natürlichen Peptidhormone.

Beide synthetisierten Substanzen sind also biologisch inaktiv. Über die Frage einer antagonistischen Wirkung werden weitere Versuche Klarheit bringen.

* Herrn Prof. Dr. E. Werle bin ich zu großem Dank verpflichtet, daß die biologische Austestung der Peptide ermöglicht wurde.

II.7 Enzymatischer Abbau

Die biologische Inaktivität der synthetisierten Naturstoffanaloga kann auf Racemisierung der in der l-Form eingesetzten Aminosäuren im Laufe der Synthese zurückzuführen sein. Daher wurden beide Peptide einer enzymatischen Spaltung unterworfen: Enzymatische Aufspaltung der Peptidbindung erfolgt nur bei Vorliegen der l-Konfiguration⁵³⁾.



Bei der Knüpfung der Bindungen 3-4, 4-5, 5-6 und 8-9 k o n n t e keine Racemisierung eingetreten sein, da diese Bindungen Prolyl- bzw. Glycylbindungen sind (vgl. II.5).

Nicht untersucht werden konnte die enzymatische Spaltbarkeit der Bindungen 2-3 und 7-8, der Bindungen also, an denen Prolin mit seinem Stickstoff beteiligt ist. Dererlei Bindungen sind nur durch spezifische Prolinasen spaltbar, deren Reinigung noch aussteht und die daher nicht zur Verfügung standen. Bei der Knüpfung dieser Bindungen 2-3, bzw. 7-8 war die Nitrophenylester-, bzw. die Carbodiimidmethode bei -10° verwendet worden, Bedingungen also, unter denen kaum Racemisierung zu erwarten ist.

Die Peptidbindungen 1-2, 6-7 und 9-10 konnten enzymatisch quantitativ geöffnet werden.

II.7.a Spaltung mit Amino-peptidase

Amino-peptidasen spalten vom N-Terminus eines Peptides oder Proteins her. Die Abspaltung kommt erst an einer vor Prolin oder Hydroxyprolin stehenden Aminosäure zum Stillstand. Demzufolge wurde von Lys^{2,10}-Kallidin (XXIX) mit Hilfe von Amino-peptidase innerhalb von 3 Stunden 1 Mol Lysin abgespalten. Bei der Umsetzung von Lys^{1,9}-Bradykinin (XXV) mit Amino-peptidase konnte auch nach 60 Stunden noch kein Lysin gefunden werden (Abb. 7).

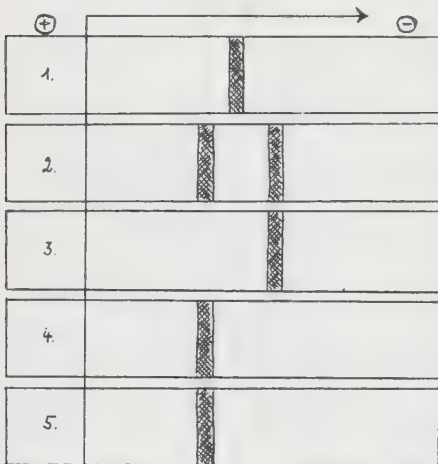


Abb. 7

Spaltung von
Lys^{2,10}-Kallidin und
Lys^{1,9}-Bradykinin
mit Amino-peptidase

1. Lys-Kallidin (Blindwert)
2. Lys-Kallidin + Enzym nach 3 Stdn.
3. Lysin
4. Lys-Bradykinin + Enzym nach 60 Stdn.
5. Lys-Bradykinin (Blindw.)

Experiment. Daten s. III.3

II.7.b Spaltung mit Trypsin

Trypsin spaltet die Peptidbindung selektiv nach einer basischen Aminosäure, also nach Arginin und Lysin, allerdings nur dann, wenn die auf Arginin oder Lysin folgende Aminosäure nicht Prolin oder Hydroxyprolin ist⁵⁴⁾.

Nach Inkubation von Lys^{2,10}-Kallidin (XXIX) mit Trypure novo (= Trypsin 3 mal kristallisiert, reinst) wurden jedoch nach 24 Stdn. statt des erwarteten e i n e m Mols Lysin stets z w e i Mol Lysin, bei Lys^{1,9}-Bradykinin (XXV), bei dem keine Spaltung erwartet wurde, stets e i n Mol Lysin gefunden, ein Ergebnis, das mit der bekannten Spezifität des Trypsins nicht übereinstimmte. Die Behandlung des freien Tetrapeptides Lysyl-prolyl-prolyl-glycin mit Trypsin wiederum zeigte erwartungsgemäß k e i n e Lysinabspaltung (Abb. 8).

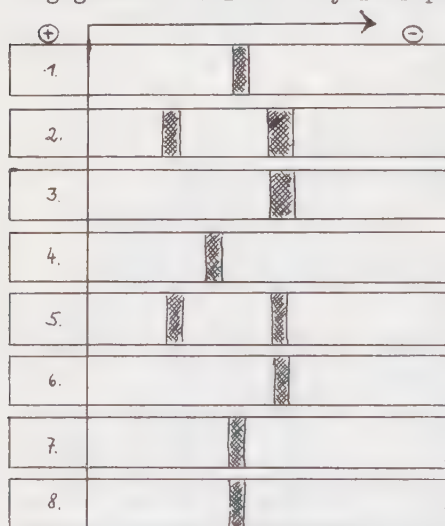


Abb. 8

Spaltung von
Lys^{2,10}-Kallidin und
Lys^{1,9}-Bradykinin mit
Trypure novo nach 24 Stdn.

1. Lys-Kallidin (Blindwert)
2. Lys-Kallidin + Enzym
3. Lysin 2 Mol
4. Lys-Bradykinin (Blindw.)
5. Lys-Bradykinin + Enzym
6. Lysin 1 Mol
7. Lys-Pro-Pro-Gly (Blindw.)
8. Lys-Pro-Pro-Gly + Enzym

Experimentelle Daten s. III.3

Die nähere Untersuchung erbrachte, daß das unerwartet abgespaltene Lysin nicht vom N-Terminus, sondern vom Carboxylende der Substrate stammte: Die NH₂-Endgruppenbestimmung sowohl nach Sanger⁵⁶⁾ als auch nach Edman⁵⁷⁾ nach der Abspaltung von 1 Mol Lysin aus Lys^{1,9}-Bradykinin (XXV) mit Hilfe von Trypure novo zeigten eindeutig n u r L y s i n als N-terminale Aminosäure. Dieses Ergebnis legte den Schluß nahe, daß die

beobachtete Spaltung auf eine im Trypure novo enthaltene Chymotrypsin-Verunreinigung zurückzuführen ist (vgl. II.7.c). Tatsächlich wurde nach Zerstörung der Chymotrypsin-Aktivität mit $n/16$ HCl⁵⁵⁾ aus Lys^{2,10}-Kallidin (XXIX) nach 3 und nach 60 Stunden nur e i n Mol Lysin, aus Lys^{1,9}-Bradykinin (XXV) k e i n Lysin abgespalten: Die Lys-Pro-Bindung war, der Spezifitätsregel für Trypsin folgend, n i c h t geöffnet worden (Abb. 9).

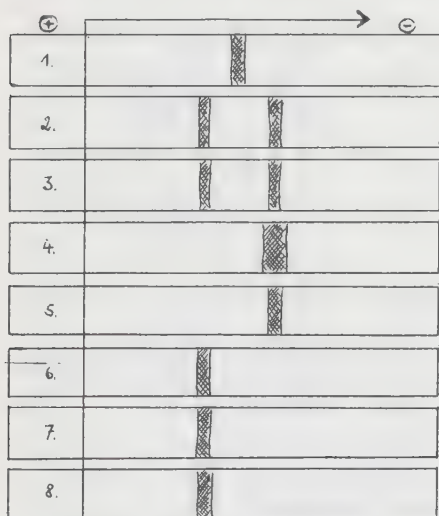


Abb. 9

Spaltung von
Lys^{2,10}-Kallidin und
Lys^{1,9}-Bradykinin
mit Trypsin

1. Lys-Kallidin (Blindwert)
2. Lys-Kallidin + Enzym
nach 3 Stunden
3. nach 60 Stunden
4. Lysin 2 Mol
5. Lysin 1 Mol
6. Lys-Bradykinin + Enzym
nach 3 Stunden
7. nach 60 Stunden
8. Lys-Bradykinin (Blindw.)

Experiment. Daten s. III.3

II.7.c Spaltung mit Chymotrypsin

Chymotrypsin spaltet Peptidbindungen nach Aminosäuren mit aromatischem Substituenten, also nach Phenylalanin und Tyrosin. Wie erwartet, wurde sowohl bei Lys^{2,10}-Kallidin (XXIX) als auch bei Lys^{1,9}-Bradykinin (XXV) durch Chymo-

trypsin zunächst innerhalb von 3 Stunden das nach Phenylalanin C-terminal stehende Lysin quantitativ abgespalten (vgl. II.7.b); sodann wurde etwas langsamer die Bindung Phe-Ser nach 24 Stunden geöffnet (Abb. 10).

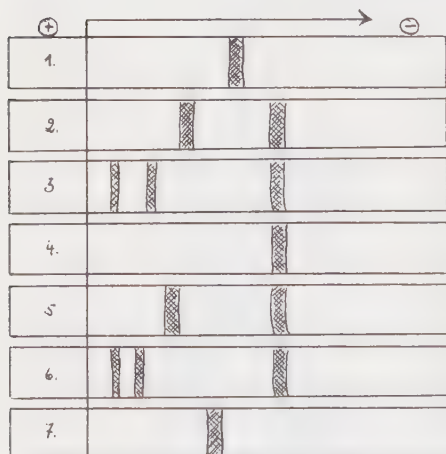


Abb. 10

Spaltung von
Lys-^{2,10}-Kallidin und
Lys-^{1,9}-Bradykinin
mit Chymotrypsin

1. Lys-Kallidin (Blindwert)
 2. Lys-Kallidin + Enzym nach 3 Stunden
 3. nach 60 Stunden
 4. Lysin
 5. Lys-Bradykinin + Enzym nach 3 Stunden
 6. nach 60 Stunden
 7. Lys-Bradykinin (Blindw.)
- Experiment. Daten s. II.3

II.7.d Spaltung mit Carboxypeptidase A + B

Carboxypeptidasegemisch spaltet Peptidbindungen vom C-Terminus her, wobei Carboxypeptidase A nur an nichtbasischen, Carboxypeptidase B nur an basischen Aminosäuren angreift⁵³). Wie erwartet, wurde schon nach 3 Stunden bei beiden getesteten Peptiden jeweils 1 Mol Lysin abgespalten. Die Freisetzung von Phenylalanin konnte auch nach 60 Stunden nur in geringem Maße beobachtet werden; anscheinend erschwert Prolin auch die Spaltung von der C-terminalen Seite her (Abb. 11).

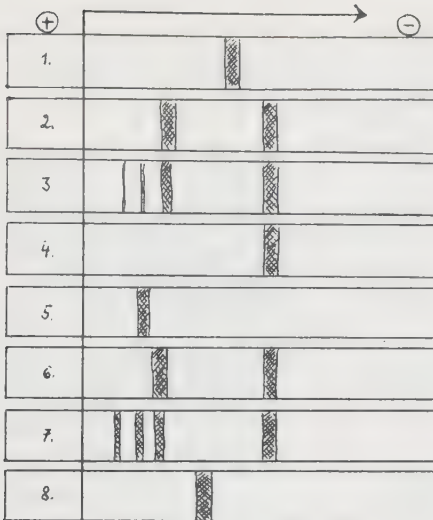


Abb. 11

Spaltung von
Lys-^{2,10}-Kallidin und
Lys-^{1,9}-Bradykinin
mit Carboxypeptidase

1. Lys-Kallidin (Blindwert)
2. Lys-Kallidin + Enzym nach 3 Stunden
3. nach 60 Stunden
4. Lysin
5. Phenylalanin
6. Lys-Bradykinin + Enzym nach 3 Stunden
7. nach 60 Stunden
8. Lys-Bradykinin (Blindw.)

Experiment. Daten s. III.3

II.7.e Spaltung mit Kollagenase

Kollagenase, ein proteolytisches Enzym aus *Clostridium histolyticum*, spaltet Sequenzen $X-P_1-R^1Gly-P_2-Y$ spezifisch, wobei X und Y Aminosäuren oder Schutzgruppen, $P_{1,2}$ Prolin oder Hydroxyprolin und R eine beliebige Aminosäure sein kann⁵⁸⁾.

Eine ähnliche Aminosäuresequenz besitzen vorliegende Kininanaloga, nur mit dem Unterschied, daß P_2 nicht Prolin oder Hydroxyprolin, sondern Phenylalanin ist. Es war interessant zu erfahren, ob diese Veränderung bereits ausreicht, den Angriff der Kollagenase zu unterbinden.

Der Versuch zeigte, daß dies der Fall war: Bei der Behandlung von Lys^{2,10}-Kallidin (XXIX) und Lys^{1,9}-Bradykinin (XXV) mit hochgereinigter Kollagenase konnte auch nach 24 Stunden keinerlei Spaltung festgestellt werden, ein weiterer Beweis für die strenge Spezifität dieses Enzyms (Abb. 12).

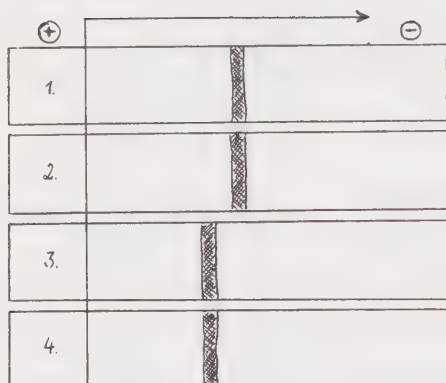


Abb. 12

Spaltungsversuch von
Lys^{2,10}-Kallidin und
Lys^{1,9}-Bradykinin
mit Kollagenase

1. Lys-Kallidin (Blindwert)
2. Lys-Kallidin + Enzym
nach 24 Stunden
3. Lys-Bradykinin + Enzym
nach 24 Stunden
4. Lys-Bradykinin (Blindw.)

Die enzymatischen Abbauversuche an synthetischem Kallidin und Bradykinin* verliefen analog. Dies zeigt, daß bei der vorliegenden Synthese des Lys^{2,10}-Kallidins und des Lys^{1,9}-Bradykinins k e i n e r l e i Racemisierung aufgetreten ist, daß also die biologische Inaktivität beider Naturstoffanaloga tatsächlich auf die veränderte chemische Struktur, also auf die Unmöglichkeit einer Reaktion der Molekeln mit dem natürlichen Kininrezeptor zurückzuführen ist.

* Der Fa. Sandoz AG bin ich für die freundliche Überlassung von Vergleichssubstanz sehr dankbar.

III. Experimenteller Teil

Die Schmelzpunkte wurden in offenen Kapillaren bestimmt, sie sind nicht korrigiert.

Zur Messung der Drehwerte wurde ein lichtelektrisches Polarimeter der Fa. Zeiss verwendet; die Werte für die D-Linie sind berechnet.

Die C,H,N-Analysen führte das Mikroanalytische Labor Ilse Beetz, Kronach/Ofr. durch. Die Substanzen wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 30-40° und $2 \cdot 10^{-4}$ Torr getrocknet.

Die chromatographische Reinheitsprüfung wurde mit Hilfe des Dünnschichtverfahrens nach Stahl³⁷⁾ auf Kieselgel-G-Schichten einer durchschnittlichen Dicke von 275 μ durchgeführt. Als Laufmittel wurden verwendet: A. Butanol/Eisessig/Wasser (6:2:2), B. Butanol/Eisessig/Wasser (1:1:1), C. Hexan/Essigester/Eisessig (10:5:0,5), D. Heptan/tert. Butanol/Eisessig (3:2:1), E. Butanol/Eisessig/Wasser/Pyridin (30:6:24:20), F. tert. Amylalkohol/Isopropanol/Wasser (10:4:5,5), G. Chloroform/Methanol (9:1). Die entwickelten Chromatogramme wurden jeweils mit Ninhydrin- und Reindel-Hoppe-Reagenz⁴⁸⁾ angefärbt.

III.1 Lys^{1,9}-Bradykinin

III.1.a Carbobenzoxyprolin (I) Hergestellt nach der Vorschrift von W. Graßmann und E. Wünsch⁶⁰⁾.

Aus Essigester/Petroläther farblose Kristallpyramiden: Schmp. 73-75°, $[\alpha]_D^{20} = -40,6^\circ \pm 0,5'$ (c=2 in Alkohol).

C₁₃H₁₅NO₄ (249,3)

III.1.b Prolinmethylester-Hydrochlorid (II) Darstellungsvorschrift nach E. Hacker⁴⁴⁾.

Farblose, sehr hygroskopische Kristalle: Schmp. 74-75° (i. geschl. Rohr).



III.1.c Carbobenzoxy-propyl-prolinmethylester (III) Dargestellt nach E. Wünsch³⁸⁾

Aus Essigester/Petroläther farblose Kristalle: Schmp. 76-78°.



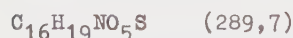
III.1.d Carbobenzoxy-propyl-prolin (IV) Herstellung dieser Verbindung nach der Vorschrift von E. Wünsch³⁸⁾.

Aus Äthanol/Wasser farblose Kristallbrocken: Schmp. 185-187°, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -103,4^\circ \pm 0,5$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20} = -121,6^\circ$.



III.1.e Glycinbenzylester-Tosylat (V) Nach einer Vorschrift von L. Zervas⁴¹⁾ dargestellt.

Aus Methanol/Äther farblose glänzende Kristallschuppen: Schmp. 132-134°.



III.1.f Carbobenzoxy-propyl-propyl-glycinbenzylester (VI)

Zu 103,9 g Carbobenzoxy-propyl-prolin (I) (0,3 Mol) und 87,9 g Glycinbenzylester-Tosylat (V) (0,3 Mol + 1,0 g), in 300 ml Dimethylformamid und 1 500 ml Acetonitril unter Erwärmen gelöst, werden nach Abkühlen auf 0° 42,0 ml Triäthylamin (0,3 Mol) unter Rühren zugegeben. Dazu fügt man nach Abkühlen auf -15° 64,8 g Dicyclohexylcarbodiimid (0,3 Mol +

3 g) und läßt das Reaktionsgemisch einige Stunden bei 0° und dann 24 Std. bei Raumtemperatur stehen. Nach erneutem Abkühlen saugt man den ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab, engt das Filtrat im Vak. ein und nimmt den Rückstand in Essigester auf. Die erhaltene Lösung wird mit 1n Salzsäure, KHCO_3 -Lösung und Wasser wie üblich gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und im Vak. eingedampft; dabei tritt Kristallisation ein.

Nach Umkristallisieren aus Äthanol farblose Kristallbrocken Schmp. 120-122°, $[\alpha]_D^{20} = -115,06^\circ \pm 0,5$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20} = -138,0^\circ$, (c = 1 in Meth.), $R_f(A) = 0,75$, $R_f(E) = 0,76$, Ausb.: 120,4 g (81,8 % d.Th.)

$\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_6$	(493,54)	Ber.	C 65,7	H 6,33	N 8,59
		Gef.	65,4	6,41	8,9

III.1.g Prolyl-prolyl-glycin (VII) 20,0 g Carbobenzoxy-prolyl-prolyl-glycinbenzylester (VI) in 100 ml Isopropanol + 5 ml Wasser und einigen Tropfen Eisessig werden in Gegenwart von Palladiumschwarz als Katalysator ca. 7 Std. bei Normaldruck wie üblich hydriert. Das Filtrat wird mit viel trockenem Äther versetzt und einige Tage bei -10° aufbewahrt, der gebildete Niederschlag abgesaugt, mit absol. Äther gewaschen und im Vak. Exsikkator scharf getrocknet. Nach Umkristallisieren aus eiskaltem Methanol/Äther (1:1): Schmp. 112-114°, $[\alpha]_D^{20} = -97,9^\circ \pm 0,5$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20} = -117,0^\circ$, (c = 1 in Meth.), $R_f(A) = 0,14$, $R_f(E) = 0,24$, Ausb.: 10,8 g (100 % d.Th.)

$\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{O}_4\text{N}_3 + \text{H}_2\text{O}$	Ber.	C 50,2	H 7,4	N 14,6
	Gef.	50,01	7,29	14,4

III.1.h Dicarbobenzoxy-lysinnitrophenylester (VIII)
41,4 g Dicarbobenzoxy-lysine (0,1 Mol) und 15,3 g p-Nitrophenol (0,11 Mol) in 300 ml Essigester werden bei 0° mit

22,7 g Dicyclohexylcarbodiimid (0,11 Mol) versetzt, 1 Stde. bei 0° und 2 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abkühlen saugt man vom Dicyclohexylharnstoff ab, engt das Filtrat im Vak. ein und nimmt den Rückstand in Essigester auf. Die erhaltene Lösung wird mit 0,1n HCl, 0,5mKHC₃O₃-Lösung und Wasser wie üblich gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vak. eingeeengt.

Der verbleibende Rückstand wird mit absol. Äther ausgekocht, abfiltriert, im Vak.Exsikkator über P₂O₅ getrocknet und gepulvert: Schmp. 75-77°, $[\alpha]_D^{20} = -23,7^\circ \pm 0,5$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20} = -29,5^\circ$ (c = 1 in Meth.), R_f(A) = 0,8, R_f(C) = 0,42, Ausb. 44,1 g (82,1 % d.Th.).

C ₂₈ H ₂₉ O ₈ N ₃	(535,56)	Ber. C 62,80 H 5,46 N 7,85
		Gef. 63,06 5,66 7,98

III.1.1 N^α-Carbobenzoxo-N^ε-BOC-lysinnitrophenylester (IX)

40,6 g N^α-Carbobenzoxo-N^ε-BOC-lysin⁶¹⁾ (0,105 Mol) - freigesetzt mit Zitronensäure aus 60,0 g N^α-Carbobenzoxo-N^ε-BOC-lysin-Dicyclohexylammoniumsalz (0,105 Mol) Schmp. 156-157°, $[\alpha]_D^{20} = +7,82^\circ \pm 0,5$ (c = 1 in Äthan.) - und 15,6 g p-Nitrophenol (0,11 Mol) in 600 ml Essigester/Acetonitril (1:1) werden bei 0° mit 24,0 g Dicyclohexylcarbodiimid (0,11 Mol) versetzt, 1 Stde. bei 0° und 2 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abkühlen auf -5° wird abgeschiedener Dicyclohexylharnstoff abgetrennt, das Filtrat im Vak. zur Trockene gebracht und der Rückstand in Essigester aufgenommen. Die erhaltene Lösung wird unter Kühlung mit Zitronensäurelösung, einem Gemisch aus 1 Teil 0,5m K₂CO₃- und 2 Teilen 0,5m KHC₃O₃-Lösung und Wasser wie üblich gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vak. eingedampft. Aus Essigester/Äther umkristallisiert: Schmp. 88-90°, $[\alpha]_D^{20} = -17,2^\circ \pm 0,5$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20} = -20,5^\circ$, (c = 1 in Aceton), R_f(A) = 0,8, R_f(C) = 0,75, Ausb. 52,9 g (93 % d.Th.).

$C_{25}H_{35}O_{10}N_3$	(537,58)	Ber. C 59,87 H 6,23 N 8,38
		Gef. 60,21 6,35 8,45

III.1.j Dicarbobenzoxyl-lysyl-prolyl-prolyl-glycin (X)

11,4 g Dicarbobenzoxyl-lysinnitrophenylester (VIII) (0,021 Mol) und 5,75 g Prolyl-prolyl-glycin (VII) (0,021 Mol) in 150 ml Chloroform/Essigester (1:1) werden mit 6 ml Triäthylamin (0,042 Mol) versetzt und 24 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt. Nach Eindampfen im Vak. wird der Rückstand in 150 ml 1n $KHCO_3$ -Lösung aufgenommen, die Lösung erschöpfend mit Essigester ausgezogen (Nitrophenol), mit Zitronensäure angesäuert und mit Essigester ausgeschüttelt. Die Essigester-extrakte werden über Na_2SO_4 getrocknet, im Vak. eingengt. Der Rückstand wird mit absol. Äther verrieben: Zers. ab 190° , $[\alpha]_D^{20} = -102,68^\circ \pm 0,5$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20} = -123,0^\circ$, (c = 1 in Meth.), $R_f(A) = 0,64$, $R_f(E) = 0,59$, Ausb. 12,1 g (85,2 % d.Th.).

$C_{34}H_{43}O_9N_5$	(665,76)	Ber. C.61,14 H 6,51 N 10,51
		Gef. 60,79 6,46 10,53

III.1.k N^α -Carbobenzoxyl- N^ϵ -BOC-lysyl-prolyl-prolyl-glycin

(XI) 16,0 g N^α -Carbobenzoxyl- N^ϵ -BOC-lysin-nitrophenylester (IX) (0,03 Mol) und 10,05 g Prolyl-prolyl-glycin (VII) (0,035 Mol) in 300 ml Chloroform/Essigester (1:1) werden in Gegenwart von 8,4 ml Triäthylamin (0,06 Mol), wie für Dicarbobenzoxyl-lysyl-prolyl-prolyl-glycin (X) beschrieben, umgesetzt und aufgearbeitet.

Der im Vak. über P_2O_5 scharf getrocknete Rückstand wird nach Verreiben mit absol. Äther beim Stehen im Kühlschrank fest: Zers. ab 170° , $[\alpha]_D^{20} = -109,3^\circ \pm 0,5$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20} = -131,25^\circ$, (c = 2 in Meth.), $R_f(A) = 0,64$, $R_f(G) = 0,13$, Ausb. 18,5 g (96 % d. Th.).

$C_{31}H_{45}O_9N_5 \cdot \frac{1}{2} H_2O$	(640,72)	Ber. C 58,12 H 7,08 N 10,93
		Gef. 57,82 7,16 10,96

III.1.1 Carbobenzoxo-serin (XII) Hergestellt nach der Vorschrift von St. Guttman und R. A. Boissonas⁴³⁾.

Aus Essigester/Äther farblose glänzende Schuppen: Schmp. $119,5^{\circ}$, $[\alpha]_D^{20} = 3,0 \pm 0,5$ ($c = 2,7$ in Meth.).

$C_{12}H_{13}NO_5$ (239,2)

III.1.m Prolinbenzylester-Hydrochlorid (XIII) Dargestellt nach R. E. Neumann und E. L. Smith⁴⁹⁾.

Aus Äthanol farblose Nadeln: Schmp. $148-148,5^{\circ}$, $[\alpha]_D^{20} = -43,3^{\circ} \pm 0,5$ ($c = 1$ in Meth.).

$C_{12}H_{17}NOCl$ (226,7)

III.1.n Carbobenzoxo-seryl-prolinbenzylester (XIV) Zu 11,9 g Carbobenzoxo-serin (XII) (0,05 Mol) und 11,3 g Prolinbenzylester-Hydrochlorid (XIII) (0,05 Mol) in 100 ml Acetonitril werden bei 0° 7 ml Triäthylamin (0,05 Mol) und danach bei -10° 11,0 g Dicyclohexylcarbodiimid (0,053 Mol) zugegeben. Nach 24 stdg. Stehen bei -10° saugt man den ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab, dampft das Filtrat im Vak. zur Trockene und nimmt den Rückstand in Essigester auf. Die erhaltene Lösung wird wie üblich mit verd. Salzsäure, $KHCO_3$ -Lösung und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und im Vak. eingeengt.

Aus Essigester/Petroläther umkristallisiert: Schmp. $105-107^{\circ}$, $[\alpha]_D^{20} = -77,28^{\circ} \pm 0,5$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20} = -93,0^{\circ}$, ($c = 1$ in Meth.), $R_f(A) = 0,77$, $R_f(D) = 0,59$, Ausb. 18,5 g (90 % d.Th.),

$C_{23}H_{26}O_6N_2$	(426,44)	Ber.	C 64,78	H 6,15	N 6,57
		Gef.	64,81	6,02	6,80

III.1.o Seryl-prolin (XV) 10,0 g Carbobenzoxo-seryl-prolinbenzylester (XIV) in Methanol/Wasser + einigen Tropfen Essigsäure werden in Gegenwart von Palladiumschwarz als Katalysator wie üblich hydriert. Beim Einengen im Vak.

und Versetzen mit Äthanol tritt Kristallisation ein.
Nadeln aus Wasser/Äthanol: Schmp. 189° , $[\alpha]_D^{20} = -108,37^{\circ} \pm 0,5$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20} = -130,0^{\circ}$, ($c = 1$ in Wasser), $R_f(A) = 0,17$, $R_f(E) = 0,3$, Ausb. 4,7 g (98 % d.Th.).

$C_8H_{14}O_4N_2$	(202,21)	Ber.	C 47,52	H 6,79	N 13,85
		Gef.	47,21	7,08	13,73

III.1.p BOC-Phenylalanin (XVI) 81,0 g Phenylalaninmethylester (0,45 Mol) - aus 98 g Phenylalaninmethylester-Hydrochlorid (0,45 Mol) nach Hillmann⁶²⁾ freigesetzt - werden mit 200,0 g BOC-Azid⁶³⁾ (1,35 Mol) 24 Stdn. bei $40-45^{\circ}$ aufbewahrt, überschüssiges Azid im Vak. abdestilliert und der verbleibende ölige Rückstand in Essigester aufgenommen. Die erhaltene Lösung wird wie üblich mit $KHCO_3$ -Lösung, Citronensäurelösung und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und im Vak. eingeengt: 110,0 g BOC-Phenylalaninmethylester (0,394 Mol) als gelbliches Öl.

Das Öl wird in Dioxan/Wasser gelöst und mit 395 ml 1n NaOH unter p_H -Kontrolle mit Thymolphthalein verseift. Nach Entfernen des Lösungsmittels säuert man mit Citronensäure an und nimmt das abgeschiedene Öl mit Essigester auf, trocknet und engt die Lösung im Vak. ein.

Aus absol. Äther/Petroläther umkristallisiert: Schmp. $83,5-85,5^{\circ}$, $[\alpha]_D^{20} = +23,85^{\circ} \pm 0,5$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20} = +29,1$, ($c = 2$ in Äthanol), $R_f(A) = 0,74$, $R_f(D) = 0,6$, Ausb. 81,2 g (68 % d.Th.).

$C_{14}H_{19}O_4N$	(265,3)	Ber.	C 63,4	H 7,24	N 5,28
		Gef.	63,5	7,04	5,5

III.1.Q BOC-Phenylalanin-nitrophenylester (XVII) 39,8 g krist. BOC-Phenylalanin (XVI) (0,15 Mol) und 22,3 g p-Nitrophenol (0,16 Mol) in 600 ml Essigester werden bei -5° mit 33,0 g Dicyclohexylcarbodiimid (0,26 Mol) versetzt, eine

Std. bei 0°, dann eine Std. bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abkühlen auf -5° filtriert man den Dicyclohexylharnstoff ab, engt die Lösung im Vak. zur Trockene ein und nimmt den Rückstand in Essigester auf.

Nach üblicher Aufarbeitung wird das erhaltene Rohprodukt aus heißem Äthanol und wenig Petroläther umkristallisiert: Schmp. 126-127°, $[\alpha]_D^{20} = -19,82^\circ \pm 0,5$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20} = -25,0^\circ$, (c = 0,5 in Meth.), $R_f(A) = 0,81$, $R_f(C) = 0,75$, Ausb. 45,5 g (78 % d.Th.).

$C_{20}H_{22}O_6N_2$	(386,41)	Ber.	C 62,45	H 5,74	N 7,38
		Gef.	62,49	5,75	7,53

III.1.r BOC-Phenylalanyl-seryl-prolin (XVIII) Zu einer Lösung von 2,02 g Seryl-prolin (XV) (0,01 Mol) in 20 ml Wasser und 10 ml 1n NaOH (0,01 Mol) werden 3,7 g BOC-Phenylalanin-nitrophenylester (XVII) (0,01 Mol) in 40 ml Dioxan gegeben und bei Raumtemperatur unter Rühren, CO_2 -Ausschluß und unter Einhalten von p_H 9,5 1n NaOH zugetropft. Innerhalb von 5-6 Stdn. werden 11 ml 1n NaOH verbraucht. Die gelb gefärbte Lösung wird unter kräftigem Rühren und Eiskühlung vorsichtig mit 11 ml 1n HCl versetzt, nach Abziehen des Dioxans im Vak. mit Wasser verdünnt und zur Entfernung von p-Nitrophenol erschöpfend mit Äther ausgezogen. Die wäßrige Phase scheidet nach Ansäuern mit Citronensäure ein Öl ab, das in Essigester aufgenommen wird. Die über Na_2SO_4 getrocknete und im Vak. eingedampfte Lösung hinterläßt ein festes Produkt, das nach Aufnehmen in heißem Essigester, Zugabe von Äther und schließlich - unter Eiskühlung und Rühren - von Petroläther amorph ausfällt. Nach längerem Rühren wird die Substanz kristallin.

Aus heißem Essigester umkristallisiert: Schmp. 122-124° Zers., $[\alpha]_D^{20} = -58,707^\circ \pm 0,5$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20} = -70,5^\circ$, (c = 1 in Meth.), $R_f(A) = 0,66$, $R_f(D) = 0,32$, Ausb. 3,3 g (62,5 % d.Th.).

$C_{22}H_{31}N_3O_7$	(449,49)	Ber.	C 58,78	H 6,94	N 9,35
		Gef.	59,26	7,18	9,34

III.1.s N^{ϵ} -Carbobenzoxyl-ysinbenzylester-Hydrochlorid (XIX)

Diese Verbindung wurde in Anlehnung an die von B.F. Erlanger und E. Brand⁶⁴⁾ bzw. R.A. Boissonnas und Mitarb.⁴⁰⁾ gegebenen Vorschriften (Benzyl- bzw. Methylester-hydrochlorid) dargestellt.

Zu einer Suspension von 155,3 g Dicarbobenzoxyl-ysin⁴⁰⁾ (0,375 Mol) in 750 ml absol. Äther werden bei -10° unter Rühren innerhalb von 30 Min. 70 ml Thionylchlorid zuge- tropft, 3 Stdn. bei Raumtemperatur, dann 3 Stdn. unter Rück- fluß gerührt, wobei das N-Carbonsäure-Anhydrid ausfällt. Nach 2-stdg. Stehen im Kühlschrank wird das Produkt abge- saugt, mit trockenem Äther gewaschen und im Vak. bei Raum- temperatur getrocknet: Schmp. 98° .

Zu einer Aufschlammung des N-Carbonsäure-Anhydrids in 750 ml absol. Äther werden unter Rühren 750 ml absol. Benzyl- alkohol zugetropft und das Reaktionsgemisch 16 Stdn. ge- rührt. Dabei erfolgt zunächst Lösung, dann tritt Abschei- dung des kristallinen Esterhydrochlorids ein.

Aus wenig heißem Wasser umkristallisiert: Schmp. $138-140^{\circ}$, $[\alpha]_D^{20} = -4,8^{\circ} \pm 0,5$, $[\alpha]_{546}^{20} = -7,03^{\circ}$, ($c = 0,5$ in 0,1n HCl), $R_f(A) = 0,69$, $R_f(E) = 0,65$, Ausb. 119,8 g (78,3 % d.Th.).

$C_{21}H_{27}O_4N_2Cl$ (406,9)

III.1.t BOC-Phenylalanyl- N^{ϵ} -Carbobenzoxyl-ysinbenzylester (XX)

26,53 g BOC-Phenylalanin (XVI) (0,1 Mol) und 40,7 g N^{ϵ} -Car- bobenzoxyl-ysinbenzylester-Hydrochlorid (XIX) (0,1 Mol) in 1000 ml Acetonitril werden bei -10° unter Rühren mit 13,95 ml Triäthylamin (0,1 Mol) und nach 15 Min. mit 20,7 g Dicyclo- Hexylcarbodiimid (0,1 Mol) versetzt. Der Ansatz wird 24 Stdn. bei -10° , dann 24 Stdn. bei Raumtemperatur aufbewahrt, mit 400 ml Dimethylformamid versetzt und nach Stehen bei -10°

auskristallisierter Dicyclohexylharnstoff abgetrennt. Das erhaltene Filtrat dampft man bei Raumtemperatur bei ca. 10^{-2} Torr ein und nimmt den Rückstand in Chloroform auf. Nach üblicher Aufarbeitung -Waschen mit Citronensäure-, KHCO_3 -Lösung und Wasser, Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen im Vak. - wird der feste Rückstand aus heißem Äthanol umkristallisiert: Schmp. $131-133^\circ$, $[\alpha]_D^{20} = -10,403^\circ \pm 0,5$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20} = -13,0^\circ$, ($c = 1$ in Meth.), $R_f(A) = 0,87$, $R_f(D) = 0,62$, Ausb. 46,0 g (74,5 % d.Th.).

$\text{C}_{35}\text{H}_{43}\text{O}_7\text{N}_3$	(617,73)	Ber.	C 68,05	H 7,02	N 6,89
		Gef.	68,26	7,13	7,00

III.1.u Phenylalanyl- N^{ϵ} -Carbobenzoxy-lysinbenzylester.

Tosylat (XXI) 30,9 g BOC-Phenylalanyl- N^{ϵ} -Carbobenzoxy-lysinbenzylester (XX) (0,05 Mol) werden mit 50 ml eiskalter Trifluoressigsäure übergossen, 30 Min. bei Raumtemperatur belassen, wobei Lösung erfolgt. Überschüssige Trifluoressigsäure wird im Vak. abgezogen, der Rückstand mit 1m KHCO_3 -Lösung und Essigester behandelt, die abgetrennte Essigesterphase mit NaCl-Lösung neutral gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und im Vak. eingeengt.

Die Lösung in absol. Äthanol wird mit 9,6 g p-Toluolsulfonsäure (0,05 Mol) versetzt; auf Zusatz von absol. Äther kristallisiert das Peptidester-Tosylat aus: Schmp. $146-147,5^\circ$, $[\alpha]_D^{20} = -6,192^\circ \pm 0,5$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20} = -7,5^\circ$, ($c = 1$ in Meth.), $R_f(A) = 0,27$, $R_f(D) = 0,15$, Ausb. 34,1 g (97 % d.Th.).

$\text{C}_{37}\text{H}_{43}\text{O}_8\text{N}_3\text{S}$	(689,84)	Ber.	C 64,42	H 6,28	N 6,09
		Gef.	64,28	6,50	6,15

III.1.v Phenylalanyl-seryl-prolyl-phenylalanyl- N^{ϵ} -Carbo-

benzoxy-lysinbenzylester-Tosylat (XXIII) 10,5 g Phenylalanyl- N^{ϵ} -Carbobenzoxy-lysinbenzylester-Tosylat (XXI) (0,015

Mol) und 6,57 g BOC-Phenylalanyl-seryl-prolin (XVIII) (0,015 Mol) in 200 ml Acetonitril werden bei 0° mit 2,1 ml Triäthylamin (0,015 Mol) versetzt und bei Raumtemperatur gerührt, bis alles in Lösung geht (ca. 15 Min.). Nach Zugabe von 3,3 g Dicyclohexylcarbodiimid (0,016 Mol) wird das Reaktionsgemisch 10 Stdn. bei 0°, danach 24 Stdn. bei Raumtemperatur aufbewahrt, mit 125 ml Dimethylformamid versetzt und auf -5° abgekühlt. Die vom Dicyclohexylharnstoff abgetrennte Lösung dampft man im Vak. bei 10⁻² Torr zur Trockene ein, nimmt den Rückstand in Essigester auf und wäscht die erhaltene Lösung wie üblich mit Citronensäure-, KHCO₃-Lösung und Wasser. Nach Trocknen über Na₂SO₄ und Abdestillieren des Lösungsmittels im Vak. wird ein fester Rückstand erhalten - BOC-Pentapeptidester (XXII) -, der wie oben für XXI beschrieben mit Trifluoressigsäure entacyliert wird. Der erhaltene Rückstand wird in 200 ml absol. Isopropanol gelöst, mit 2,9 g p-Toluolsulfonsäure (0,015 Mol) und schließlich bei -20° unter Rühren mit absol. Äther versetzt, wobei das Ester-Tosylat ausfällt. Nach dreimaligem Umkristallisieren aus Isopropanol/Äther ist das Produkt chromatographisch rein: Schmp. 136-138°, $[\alpha]_D^{20} = -36,97^\circ \pm 0,5$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20} = -44,5^\circ$, (c = 2 in Meth.), R_f(A) = 0,68, R_f(F) 0,7, Ausb. 12,5 g (81,5 % d.Th.).

C ₅₄ H ₆₄ O ₁₂ N ₆ S	(1021,22)	Ber.	C 63,41	H 6,32	N 8,23
		Gef.	62,98	6,30	8,29

III.1.w Lysin^{1,9}-Bradykinin (XXV)

a) Zu 2,11 g Dicarbobenzoxyl-lysyl-prolyl-prolyl-glycin (X) (3 mMol) und 3,09 g Phenylalanyl-seryl-prolyl-phenylalanyl-N^ε-Carbobenzoxyl-lysylbenzylester-Tosylat (3,03 mMol) (XXIII) in 10 ml Dimethylformamid werden bei 0° unter Rühren 0,42 ml Triäthylamin (3 mMol) zugegeben, die resultierende Lösung mit 80 ml Acetonitril verdünnt, 0,7 g Dicyclohexylcarbodiimid

(3 mMol + 0,08 g) zugefügt, 2 Stdn. bei 0° und vier Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach kurzem Stehen bei -5° wird vom Dicyclohexylharnstoff abgetrennt, das Filtrat im Vak. zur Trockene eingengt, die Essigesterlösung des Rückstandes wie üblich mit Citronensäure-, KHCO_3 -Lösung und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und im Vak. eingengt. Der Rückstand (in der Hauptmenge Carbobenzoxy-Nonapeptidester XXIVa) wird in 50 ml Methanol gelöst, mit 5 ml Wasser und 5 ml Eisessig versetzt und in Anwesenheit von Palladiumschwarz als Katalysator bei Normaldruck über 24 Stdn. wie üblich hydriert. Nach Einengen im Vak. resultiert ein Rohprodukt, das in 40 ml Pyridin/Eisessig-Puffer p_H 4,9 gelöst und bei 2 000 V und 200 mA der trägerfreien kontinuierlichen Elektrophorese⁵²⁾ unterworfen wird (Ninhydrin-Test bei 565 m μ):

1. Frakt. (22-30): $R_f(\text{A}) = 0,23$ mit Spuren Hauptprodukt

2. Frakt. (31-36): $R_f(\text{A}) = 0,05$ Hauptprodukt

3. Frakt. (37-42): $R_f(\text{A}) = 0,13$ mit Spuren Hauptprodukt

Die 2. Fraktion (31-36) dampft man im Vak. bei möglichst tiefer Temperatur zur Trockene ein. Nach Entfernen des Puffers (Pyridinacetat) im Hochvak. nimmt man den Rückstand in ca. 10 ml 1n Essigsäure auf und lyophilisiert. Das im Vak. über P_2O_5 getrocknete feste Produkt wird in absol. Methanol gelöst und unter Rühren bei -10° mit absol. Äther gefällt: Schmp. 145-149°, $[\alpha]_\text{D}^{20} = -66,88^\circ \pm 0,5$, bzw. $[\alpha]_{546}^{20} = -80,0^\circ$, ($c = 0,5$ in Meth.), $R_f(\text{B}) = 0,28$, $R_f(\text{E}) = 0,38$, Ausb. 1,2 g (52 % d.Th.).



Elementaranalyse:	Ber.	C 55,98	H 7,3	N 13,28
	Gef.	56,20	7,11	13,27

Aminosäureanalyse:	<u>Gly</u>	<u>Ser</u>	<u>Phe</u>	<u>Pro</u>	<u>Lys</u>
Ber.	1	1	2	3	2
Gef.	1,0	1,0	2,0	2,99	2,0

b) 1,28 g N^{α} -Carbobenzoxy- N^{ϵ} -BOC-lysyl-prolyl-prolyl-glycin (VIII) (2 mMol) und 2,06 g Phenylalanyl-seryl-prolyl-phenylalanyl- N^{ϵ} -Carbobenzoxy-lysinbenzylester·Tosylat (XXIII) (2,02 mMol) werden wie unter a) beschrieben, mit 0,45 g Dicyclohexylcarbodiimid (2 mMol + 0,05 g) zum Carbobenzoxy-Nonapeptidester (XXIVb) umgesetzt. Das im Vak. zur Trockene eingeeengte Filtrat wird bei Raumtemperatur mit 50 ml Trifluoressigsäure übergossen. Nach 1-stdg. Stehen, wobei Lösung erfolgt, wird die überschüssige Trifluoressigsäure im Vak abgezogen, der Rückstand in 20 ml 70proz. Methanol aufgenommen und die Lösung über eine kleine Säule mit Dowex II (Acetatform) gegeben. Das Eluat wird wie üblich über 24 Stdn. bei Normaldruck hydrogenolytisch decarbobenzoxyliert und aufgearbeitet. Das erhaltene Rohprodukt in 30 ml Pyridin/Eisessig-Puffer p_H 4,9 wird, wie unter a) beschrieben, der trägerfreien kontinuierlichen Elektrophorese unterworfen (Ninhydrin-Test bei 565 m μ):

1. Frakt. (20-28): $R_f(A) = 0,21$ mit Spuren Hauptprodukt
2. Frakt. (29-34): $R_f(A) = 0,05$ Hauptprodukt
3. Frakt. (35-40): $R_f(A) = 0,12$

Die 2. Fraktion (29-34) wird, wie unter a) beschrieben, aufgearbeitet: Schmp. 146-149°, $[\alpha]_D^{20} = -66,74^\circ \pm 0,5$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20} = -79,2^\circ$, ($c = 0,5$ in Meth.), $R_f(B) = 0,29$, $R_f(E) = 0,38$, Ausb. 0,85 g (55 % d.Th.).



III.2 Lysin^{2,10}-Kallidin

III.2.a N^{ϵ} -BOC-lysyl-prolyl-prolyl-glycin (XXVI) 7 g N^{α} -Carbobenzoxy- N^{ϵ} -BOC-lysyl-prolyl-prolyl-glycin (XI) in 50 ml Methanol + einigen Tropfen Eisessig werden in Anwesen-

heit von Palladiumschwarz als Katalysator bei Normaldruck wie üblich hydriert. Der nach Eindampfen im Vak. erhaltene Rückstand wird mit absol. Äther verrieben: das Produkt ist für die weitere Umsetzung genügend rein $R_f(A) = 0,31$, Ausb. 5,5 g (100 % d. Th.).

$C_{23}H_{39}O_7N_5$ (498,58)

III.2b N^α -Carbobenzoxymethyl-BOC-lysyl-N $^\epsilon$ -BOC-lysyl-prolyl-prolyl-glycin (XXVII) Zu 2,5 g N^α -Carbobenzoxymethyl-BOC-lysinnitrophenylester (IX) (5 mMol) und 2,6 g N $^\epsilon$ -BOC-lysyl-prolyl-prolyl-glycin (XXVI) (5 mMol Rohprodukt) in 15 ml Tetrahydrofuran/Dioxan/Wasser (2:4:1) wird unter Rühren ein Gemisch von 1n NaOH/Dioxan (1:1) so lange zugegeben, bis der p_H der Lösung über einige Stunden konstant 9 bleibt. Nach weitgehender Entfernung der organischen Lösungsmittel im Vak. wird die verbleibende Lösung mehrmals mit Essigester extrahiert, mit Citronensäurelösung angesäuert und das abgeschiedene Öl in Essigester aufgenommen. Nach Auswaschen der Säure mit Wasser und Trocknen über Na_2SO_4 wird die Lösung im Vak. zur Trockene gebracht, der erhaltene Rückstand in wenig tert. Butanol/Dioxan aufgenommen und in viel absol. Äther bei -20° unter Rühren hineinflutriert.

Der abgesaugte Niederschlag wird im Vak. über P_2O_5 getrocknet: Zers. ab 140° , $[\alpha]_D^{20} = -88,87^\circ \pm 0,5$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20} = -106,25^\circ$, ($c = 2$ in Meth.). $R_f(A) = 0,68$, $R_f(E) = 0,64$, Ausb. 3,4 g 85,9 % d.Th.).

$C_{42}H_{65}O_{12}N_7 \cdot \frac{1}{2} H_2O$	(689,0)	Ber.	C 58,05	H 7,66	N 11,38
		Gef.	57,88	7,32	11,42

III.2.c Lysin^{2,10}-Kallidin (XXIX)

1,74 g N^α -Carbobenzoxymethyl-BOC-lysyl-N $^\epsilon$ -BOC-lysyl-prolyl-prolyl-glycin (XXV) (2 mMol) und 2,4 g Phenylalanyl-seryl-prolyl-phenylalanylmethyl-Carbobenzoxymethyl-lysinnitrophenylester-Tosylat

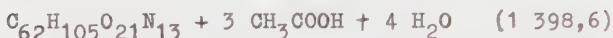
(XXIII) (2 mMol) in 10 ml Dimethylformamid werden bei 0° unter Rühren mit 0,28 ml Triäthylamin (2 mMol) versetzt, die resultierende Lösung mit 70 ml Acetonitril verdünnt, 0,45 g Dicyclohexylcarbodiimid (2 mMol + 0,03 g) zugefügt, 2 Stdn. bei 0° und 4 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach kurzem Stehen bei -5° wird vom Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, die erhaltene Lösung im Vak. zur Trockene eingeeengt und die Essigesterlösung des Rückstandes wie üblich mit Citronensäurelösung, KHCO_3 -Lösung und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und im Vak. eingeeengt. Das gelbliche Rohprodukt (Carbobenzoxycarboxy-BOC-Nonapeptidester XXVIII) wird mit 30 ml Trifluoressigsäure übergossen und 1 Std. bei Raumtemperatur bis zur Lösung stehen gelassen. Überschüssige Trifluoressigsäure zieht man im Vak. ab, nimmt den Rückstand in 20 ml 70proz. Methanol auf, gibt die Lösung über eine kleine Säule mit Dowex II (Acetatform), versetzt das Eluat mit 5 ml Eisessig und unterwirft es der üblichen hydrolytischen Decarbobenzoxycarboxylierung über 24 Stdn. bei Normaldruck. Das nach üblicher Aufarbeitung resultierende Rohprodukt wird in 20 ml Pyridin/Eisessig-Puffer pH 4,9 gelöst und bei 2 000 V und 200 mA der trägerfreien kontinuierlichen Elektrophorese unterworfen (Ninhydrin-Test bei 565 $\text{m}\mu$):

1. Frakt. (22-28): $R_f(\text{B}) = 0,74$
2. Frakt. (30-44): $R_f(\text{B}) = 0,21$ Hauptprodukt
3. Frakt. (45) : $R_f(\text{B}) = 0,21$ und
0,42
4. Frakt. (46-47): $R_f(\text{B}) = 0,42$

Die 2. Fraktion (30-44) wird lyophilisiert, der Rückstand in 10 ml Wasser gelöst, mit 0,5 ml Eisessig versetzt und nochmals lyophilisiert.

Aus der methanolischen Lösung fällt die Verbindung auf Zusatz von absol. Äther; sie wird abgesaugt und im Vak. ge-

trocknet: Schmp. unscharf bei 138° , $[\alpha]_D^{20} = -77,29^{\circ} \pm 0,5$
bzw. $[\alpha]_{546}^{20} = -93,0^{\circ}$, (c 3 0,5 in Meth.), $R_f(B) = 0,21$,
 $R_f(E) = 0,29$, Ausb. 1,6 g (59 % d.Th.).



Elementaranalyse	Ber.	C 53,44	H 7,57	N 13,02
	Gef.	53,84	7,57	13,05

Aminosäureanalyse:	Gly	Ser	Phe	Pro	Lys
Ber.	1	1	2	3	3
Gef.	1,03	1,02	2,07	3,08	2,81

III.3 Enzymchemische Versuche

Jeweils 2 mg Peptid und 0,2 mg Enzym werden in 0,2 ml Veronalpuffer p_H 8,5 gelöst und nach Zusatz eines kleinen Tropfens Toluol bei 25° inkubiert. Zu jedem Test wird ein entsprechender enzymfreier Blindwert mitangesetzt. Nach 1, 2, 3, 5, 24, und 60 Stdn. werden auf jeweils einen Papierelektrophoresestreifen (Schleicher & Schüll 2043 a Mgl) gleiche Mengen aus diesen Ansätzen und die berechnete Menge der abgespaltenen Aminosäuren aufgetragen und in einer Elphor H Apparatur nach Graßmann und Hannig⁶⁵⁾ in Pyridin/Eisessig-Puffer p_H 4,9 bei 400 V und 3,5 mA/Streifen über 1,5 Stdn. der Elektrophorese unterworfen.

Nach Trocknen der Streifen werden diese mit einer Lösung aus 1 g Ninhydrin, 10 ml Phenol und 90 ml n-Butanol getränkt und im Wasserdampf bei 120° angefärbt.

Zu einer quantitativen Auswertung können diese entwickelten Papierstreifen transparent gemacht und im Extinktionschreiber bei 565 mμ ausgemessen werden⁶⁵⁾. Die Methode ist genau ($\pm 5\%$) und gut reproduzierbar. Soweit solche Bestimmungen durchgeführt wurden, konnten die abgespaltenen Aminosäuren nach Ausplanimetrieren der Extinktionskurven in der erwarteten Menge, dh., in 100 proz. Ausbeute gefunden werden.

Zu den Abbaupversuchen wurden folgende Enzyme verwendet:

Amino-peptidase: Leucin-Amino-peptidase, Mann Research Lab.,
New York, USA.

Carboxypeptidase: 5x krist., H₂O-Susp., Mann Res. Lab., N.Y.

Chymotrypsin: 3x krist., Mann Res. Lab., N.Y.

Kollagenase: Worthington Biochem. Corp., Freehold, N.J., USA.
Reinigung dieses Präparates durch Elektrophorese
und Säulenchromatographie an Polyamid: Frei von
Amidase und Peptidasen*.

Trypsin: Trypure novo (= Trypsin 3x krist., reinst), Novo
Industrie GmbH., Mainz.

* pers. Mitteilung: Dr. L. Strauch, MPI f. Eiweiß- u. Lederf.

IV. Zusammenfassung

1. Im Rahmen der Darstellung von Naturstoff-Analoga wurde die Aminosäure Arginin der Peptidhormone Bradykinin und Kallidin durch Lysin ersetzt, um Schlüsse auf die spezifische Wirkungsweise der Guanidogruppe des Arginins zu ziehen. Dazu wurden Lys^{1,9}-Bradykinin und Lys^{2,10}-Kallidin durch Verknüpfen der synthetisch aufgebauten Bruchstücke Dicarbobenzoxyl-lysyl-prolyl-prolyl-glycin und N^α-Carbobenzoxyl-N^ε-BOC-lysyl-prolyl-prolyl-glycin bzw. N^α-Carbobenzoxyl-N^ε-BOC-lysyl-N^ε-BOC-lysyl-prolyl-prolyl-glycin mit Phenylalanyl-seryl-prolyl-phenylalanyl-N^ε-Carbobenzoxyl-lysinbenzylester zum geschützten Nona- bzw. Dekapeptid, darauffolgende Abspaltung der Schutzgruppen und Reinigung der Naturstoff-Analoga in der trägerfreien kontinuierlichen Elektrophorese dargestellt.
2. Die synthetisierten Substanzen wurden im biologischen Test auf ihre Wirksamkeit geprüft. Beide Analoga waren in hoher Dosis biologisch inaktiv.
3. Um zu prüfen, ob die biologische Unwirksamkeit tatsächlich auf der chemischen Veränderung der natürlichen Moleküle beruht und nicht eine Folge von evtl. Racemisierung im Laufe der Synthese war, wurden die Peptide einem enzymatischen Abbau unterworfen. Es wurde gezeigt, daß die Spaltbarkeit beider Peptide durch Aminopeptidase, Trypsin, Chymotrypsin, Kollagenase und Carboxypeptidase völlig analog der natürlichen Kinine war und daß bei der Synthese keine Racemisierung eingetreten war.

V . L i t e r a t u r

- 1) Braun-Menendez E., I.C.Fascio-
colo, L.Leloir und I.M.Munoz, Rev.Soc.Argent.Biol. 15, 420 (1939);
Skeggs I.H.jr., Ber.ges.Physiol. 169, 81 (1954);
187, 293 (1957);
Peart W.S., Biochem.J. 59, 300 (1955);
Elliott D.F. und W.S.Peart, Nature(London) 177, 527 (1956).
- 2) Rocha e Silva M., W.T.Beraldo
und G.Rosenfelder, Amer.J.Physiol. 156, 261 (1949);
Elliott D.F., G.T.Lewis und Biochem.J. 74, 15P (1960);
E.W.Horton, 76, 16P (1960);
78, 60 (1961).
- 3) Werle E., I.Trautschold und Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem.
G.Leysath, 326, 174 (1961);
Pierce J.B. und M.Webster, Biochem.biophys.Res.Comm. 5, 353 (1961)
- 4) von Euler U.S. und H.Gaddum, J.Physiol. 72, 74 (1931);
Pernow B., Acta physiol.Scand. 29, 105 (1953);
34, 295 (1955);
Franz J., R.A.Boissonnas und
E.Stürmer, Helv.chim.Acta 44, 881 (1961);
Häfeley W. und A.Hürlimann, Experientia(Basel) 18, 297 (1962);
Boissonnas R.A., J.Franz und
E.Stürmer, Ann.N.Y.Acad.Sci. 104, 376 (1963);
Vogler K. und W.Häfeley, ibid. 378;
Zuber H, ibid. 391.
- 5) Erspamer V., Ann.Rev.Pharmacol. 1, 196 (1961).
- 6) Habermann E., 27.Tagg.Dtsch.Pharmak.Ges.Wien 1962.
- 7) Werle E., Angew.Chem. 73, 689 (1961).
- 8) Trautschold I. und G.Rüdel, Klin.Wochenschr. 41, 297 (1963).
- 9) Margolis J., J.Physiol.(London) 144, 1 (1958);
Margolis J. und E.A.Bishop, Nature(London) 194, 749 (1962).

- 10) Frey K., H.Kraut und E.Werle, Kallikrein (Padutin), Enke Verlag, Stuttgart 1950.
- 11) Faktor XII., Documenta Geigy, 6.Aufl. 552 (1960).
- 12) Werle E., R.Kehl und K.Koebke, Biochem.Z. 320, 372 (1950);
Habermann E. und G.Rosenbusch, Naunyn-Schmiedeberger's Arch.exper. Path.Pharmak. 243, 357 (1962).
- 13) Werle E., W.Götze u.A.Keppler, Biochem.Z. 289, 217 (1937).
- 14) Werle E., Angew.Chem. A60, 53 (1948).
- 15) Werle E., R.Ehrlicher und K.Koebke, Biochem.Z. 322, 27 (1951).
- 16) Rocha e Silva M., W.T.Beraldo und G.Rosenfelder, Amer.J.Physiol. 156, 261 (1949);
Andrade S.O., C.R.Dinitz und M.Rocha e Silva, Arch.int.Pharmacodyn. 95, 100 (1953);
Andrade S.O. und Rocha e Silva, Biochem.J. 64, 701 (1956).
- 17) Nicolaides E.D., H.A.De Wald, P.G.Shorleyn und H.Collier, Nature(London) 187, 773 (1960);
Boissonnas R.A., St.Guttman, P.A.Jaquenoud, H.Konzett und E.Stürmer, Experientia(Basel) 16, 326 (1960).
- 18) Elliott D.F., G.T.Lewis und E.W.Horton, Biochem.biophys.Res.Comm. 3, 87 (1960).
- 19) Boissonnas R.A., St.Guttman und P.A.Jaquenoud, Helv.chim.Acta 43, 1349 (1960);
Boissonnas R.A., St.Guttman, P.A.Jaquenoud, J.Pless und E.Sandrin, Ann.N.Y.Acad.Sci. 104, 5 (1963);
Guttman St., J.Pless und R.A.Boissonnas, Helv.chim.Acta 45, 170 (1962).
- 20) Pless J., E.Stürmer, St.Guttman und R.A.Boissonnas, Helv.chim.Acta 45, 394 (1962).
- 21) Elliott D.F., G.P.Lewis und D.G.Smyth, Biochem.J. 87, 21P (1931).

- 22) Webster M.E. und J.B.Pierce, Conference on structure and function
of biol. active peptides Bradykinin,
Kallidin and congeners, New York 1962;
Elliott D.F., *ibid.*
- 23) Werle E., R.Kehl und K.Koebke, *Biochem.Z.* 321, 213 (1950).
- 24) Holz P., B.Heinke und S.Berck, *Experientia*(Basel) 18, 184 (1962);
Stürmer E. und B.Berde, *Naunyn-Schmiedeberger's Arch.exper.*
Path.Pharmak. 243, 355 (1962).
- 25) Konzett H. und E.Stürmer, *Brit.J.Pharmacol.* 15, 544 (1960).
- 26) Bodanszky M., J.T.Sheehan,
M.A.Ondetti und S.Lande, *J.Amer.chem.Soc.* 85, 991 (1963).
- 27) Schwyzer R., *Helv.chim.Acta* 44, 667 (1961).
- 28) Bergmann M. und L.Zervas, *Ber.dtsch.chem.Ges.* 65B, 1192 (1932).
- 29) McKay F.C. und N.Albertson, *J.Amer.chem.Soc.* 79, 4686 (1957);
Anderson G.W. und McGregor, *ibid.* 79, 6180 (1957).
- 30) Greenstein O.J.P. und
M.Winitz, *The Chemistry of the Amino Acids*,
J.Wiley & S., New York/London 1960.
- 31) Miller H.K. und H.Waelsch, *J.Amer.chem.Soc.* 74, 1092 (1952).
- 32) Schwarz H. und K.Arakawa, *J.Amer.chem.Soc.* 81, 5691 (1959).
- 33) Goldschmitt St.,
Goldschmitt St. und
H.Lautenschlager, *Liebigs Ann.Chem.* 580, 76 (1953).
- 34) Sheehan J.C. und G.P.Hess, *J.Amer.chem.Soc.* 77, 1067 (1955);
Sheehan J.C., M.Goodman und
G.P.Hess, *ibid.* 78, 1367 (1961).
- 35) Bodanszky M., *Nature*(London) 175, 685 (1955).
- 36) Hofmann K., M.E.Woolner, G.
Spühler und E.T.Schwartz, *J.Amer.chem.Soc.* 80, 1486 (1958).
- 37) Stahl E., *Z.analyt.Chem.* 181, 244 (1961).
- 38) Wünsch E., *Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem.*
332, 288 (1963).
- 39) North M.B. und G.T.Young, *Chem. und Ind.* 1597 (1955);
Schwartz H. und F.M.Bumpus, *J.Amer.chem.Soc.* 81, 890 (1959);
Young G.T., *Coll.Czech.Chem.Comm.* 24, 39 (1959).

- 40) Du Vigneaud V. und C.E.Meyer, J.Biol.Chem. 99, 143 (1932);
Schwyzer R., Record.chem.Progress 20, 147 (1959);
Brenner M., Coll.Czech.Chem.Comm. 24, 47 (1959).
- 41) Zervas L., M.Winitz und
J.P.Greenstein, J.org.Chemistry 22, 1515 (1957).
- 42) Boissonnas R.A., St.Guttman, Helv.chim.Acta 41, 1878 (1958).
P.A.Jaquemoud und E.Sandrin,
- 43) Guttman St. und R.A.Boissonnas, Helv.chim.Acta 41, 1852 (1958).
- 44) Hacker E., Dipl.Arbeit Univ.München 1957.
- 45) Boissonnas R.A., Helv.chim.Acta 34, 874 (1951).
- 46) Harris J.I. und J.S.Fruton, J.biol.Chemistry 191, 143 (1951).
- 47) Hofmann K., A.Jöhl, A.E.Fur-
lenmeier und H.Kappeler, J.Amer.chem.Soc. 79, 1636 (1957).
- 48) Shepherd R., S.Wilson, K.Ho-
ward, P.Bell, D.Davies, S.Da-
vis, E.Eigner u. N.Shakespeare, J.Amer.chem.Soc. 78, 5072 (1956).
- 49) Neumann R.E. und E.Smith, J.biol.Chemistry 193, (1951).
- 50) Peterson E.A. und H.A.Sober, J.Amer.chem.Soc. 78, 751 (1956).
- 51) Graßmann W. und K.Hannig, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem.
292, 32 (1953).
- 52) Graßmann W. und K.Hannig, Dtsch.Bundes-Pat. 805399 (1949);
Hannig K., Z.analyt.Chemistry 181, 244 (1961).
- 53) Zuber H., Chimia 14, 405 (1960).
- 54) Grimm L. und W.Graßmann, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem.(i.Dr.)
55) Kunitz M. und J.A.Nortrop, Abderhalden 1213 (1936).
- 56) Sanger F., Biochem.J. 39, 507 (1945).
- 57) Edman P., Acta chem.Scand. 4, 277 (1950);
Blombäck B. und J.Yamashina, Arkiv f. Kemi 12, 299 (1958).
- 58) Nordwig A., Das Leder 13, 10 (1962);
Graßmann W., L.Strauch u.A.Nordwig, Hoppe-Seyler 332, 325 (1963).
- 59) Reindel F. und A.Hoppe, Chem.Ber. 87, 1103 (1954).
- 60) Graßmann W. und E.Wünsch, Chem.Ber. 91, 462 (1958).

- (61) Schwyzer R. und W.Rittel, Helv.chim.Acta 44, 159 (1961);
Sturm K., R.Geiger und
W.Siedel, Chem.Ber. 96, 609 (1931).
(62) Hillmann G., Z.Naturforsch. 1, 682 (1946).
(63) Carpino L.A., J.Amer.chem.Soc. 79, 98 (1957).
(64) Erlanger B.F. und E.Brand, J.Amer.chem.Soc. 73, 4025 (1951).
(65) Graßmann W. und K.Hannig, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem.
290, 1 (1952).

L e b e n s l a u f

Am 21. April 1933 wurde ich als Sohn des Universitätsprofessors Dr. med. Leopold Heidrich und seiner Ehefrau, der Apothekerin Ruth Heidrich, geb. Sokoll in Breslau/Schles. geboren. Nach dem Besuch der Volksschule und der Grundklasse der Oberschule in Breslau setzte ich die Oberschulbildung an der Oberrealschule für Jungen in Ingolstadt/Donau fort und bestand dort 1952 das Abitur.

In den Jahren 1952-1954 praktizierte ich in der Augusta-Apotheke in Augsburg, begann danach an der Universität Erlangen das Pharmaziestudium und beendete dieses im Jahre 1957 an der Universität München mit dem Staatsexamen.

Auf diese Ausbildung aufbauend legte ich im Jahre 1959 das Vordiplom für Chemiker an der Universität München ab und bestand an derselben Universität im Jahre 1961 die Diplomhauptprüfung.

Von Mai 1961 bis Mai 1962 war ich am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung in München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Graßmann mit der Ausführung meiner Diplomarbeit "Zur Synthese eines neuen Kollagenasesubstrates" beschäftigt. Anschließend arbeitete ich am selben Institut an vorliegender Arbeit.

Ab November 1962 wurde ich im Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung mit einer Hilfsassistentenstelle und ab Januar 1964 mit einer Assistentenstelle betraut.

